

**Untersuchungen zur Hydroxyprolin-
bestimmung im Urin**

RÜDIGER UTECH

Mainz 1978

Aus der Hautklinik der
Johannes Gutenberg — Universität
Mainz

(Leiter: Prof. Dr. med. G.W. Korting)

**Untersuchungen zur Hydroxyprolin-
bestimmung im Urin**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Zahnmedizin
der Johannes Gutenberg Universität in Mainz

den Medizinischen Fachbereichen
vorgelegt von
RÜDIGER UTECH
aus Kassel

Mainz 1978



Fachbereichsdekan: Herr Professor Dr. E. Straub

1. Gutachter : Herr Professor Dr. B. Morsches

2. Gutachter : Herr Professor Dr. H. Holzmann

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
1. Einleitung.....	1
1.1. Kollagenstoffwechsel.....	2
1.1.1. Biosynthese.....	2
1.1.2. Umsatz, Abbau und Ausscheidung.....	4
1.2. Methoden zur Hydroxyprolinbestimmung.....	8
2. Problemstellung.....	11
3. Experimenteller Teil.....	13
3.1. Untersuchungen zur Hydrolyse.....	13
3.2. Auswahl der Trennmethoden.....	13
3.2.1. Abtrennung von Störfaktoren nach STALDER (1965)...	16
3.2.2. Abtrennung von störenden Komponenten nach Le ROY et al. (1964).....	17
3.2.3. Isolierung des Hydroxyprolins nach FIRSCHEIN u. SHILL (1966).....	17
3.2.4. Die Bestimmungsmethode nach GOVERDE und VEENKAMP (1972).....	18
3.2.5. Arbeitsvorschrift für die modifizierte Hydroxy- prolinbestimmung nach STEGEMANN (1958).....	20
3.2.6. Extraktion von störenden Begleitstoffen nach KIVIRIKKO et al. (1967).....	21

3.3.	Überprüfung der Trennmethoden.....	23
3.3.1.	Elution des Hydroxyprolins.....	23
3.3.1.1.	Methode nach STALDER (1965).....	24
3.3.1.2.	Methode nach FIRSCHEIN und SHILL (1960).....	25
3.3.2.	Wiederfindungsraten.....	27
3.3.3.	Vergleich der Absorptionsspektren.....	27
3.3.4.	Extinktionsvergleich.....	31
3.3.5.	Wiederfindungsraten bei Verwendung von Urin.....	33
3.3.6.	pH-Abhängigkeit des Analysenganges.....	33
4.	Ergebnisse.....	36
4.1.	Untersuchungen zur Hydrolyse.....	36
4.2.	Elution des Hydroxyprolins.....	36
4.2.1.	Methode nach STALDER (1965).....	36
4.2.2.	Methode nach FIRSCHEIN und SHILL (1966).....	37
4.3.	Wiederfindungsraten.....	37
4.4.	Absorptionsspektren.....	38
4.5.	Extinktionsvergleich.....	40
4.6.	Wiederfindungsraten bei Verwendung von Urin.....	40
4.7.	pH-Abhängigkeit des Analysenganges.....	41
5.	Diskussion.....	42
5.1.	Hydrolyse	42

III.

Seite

5.2.	Elution des Hydroxyprolins.....	43
5.3.	Wiederfindungsrate, Absorptionsspektrum, Empfindlichkeit.....	43
5.4.	pH-Abhängigkeit des Analysenganges.....	45
6.	Zusammenfassung.....	47
7.	Literaturverzeichnis.....	49
8.	Anhang.....	63

1. Einleitung

Das Skleroprotein Kollagen stellt einen wichtigen Bestandteil des Mesenchyms bei Säugetieren und Menschen dar, wo es mit seinen speziellen Differenzierungsformen etwa ein Drittel des Körperproteins ausmacht.

Kollagen unterscheidet sich in der Aminosäurezusammensetzung von anderen Proteinen in charakteristischer Weise (GRASSMANN et al., 1965; REICH, 1966; HANNIG u. NORDWIG, 1967; KORTING u. HOLZMANN, 1967).

So liegt beim Kollagen im Gegensatz zu anderen Proteinen ein konstanter und hoher Anteil der Aminosäuren Glycin, Prolin und Hydroxyprolin vor, wobei insbesondere das Vorkommen von Hydroxyprolin und Hydroxylysin als spezifisch für Kollagen betrachtet werden kann (GRASSMANN et al., 1965; REICH, 1966).

Wie Tabelle 1 zeigt, finden sich lediglich im Elastin noch geringe Mengen von Hydroxyprolin.

Aminosäure	Kollagen TRISTAM (1157)	Elastin TRISTAM (1157)	Keratin TRISTAM (1157)	Fibroin LUCAS et al. (687)	Fibrinogen TRISTAM (1157)	Casein HIPPEL et al. (470)
Glycin	363,0	376,0	87,0	571,0	74,7	26,8
Prolin	131,3	135,8	82,6	3,9	49,5	71,6
Hydroxyprolin	107,0	9,4	--	--	--	--
Hydroxylysin	6,8	--	--	--	--	--
Tyrosin	5,5	7,7	25,7	66,6	30,4	40,3
Tryptophan	--	--	8,8	2,0	16,0	9,8
Cystin/2	--	5,0	98,9	--	19,0	3,7
Saure AS	124,3	27,0	150,1	30,1	197,2	205,1
Basische AS	91,7	10,0	85,4	12,0	124,9	203,3

Tab. 1: Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von Kollagen mit ~~der~~ einiger anderer Proteine (nach REICH, 1966)

Dieses annähernd einzigartige Vorkommen des Hydroxyprolins innerhalb des Kollagens ist Ausdruck eines besonderen Synthesemechanismus, auf den nachfolgend näher eingegangen werden soll.

1.1. Kollagenstoffwechsel

1.1.1. Biosynthese

Die Biosynthese des Kollagens folgt zunächst den allgemein geltenden Prinzipien der Proteinsynthese (REICH, 1966; CHVAPIL u. HURYCH, 1968). Eine Besonderheit stellt jedoch der Einbau des Hydroxyprolins in die Polypeptidketten dar. Diese Aminosäure wird nämlich nicht direkt eingebaut, vielmehr wird bei der Kollagensynthese zunächst ein Hydroxyprolin-freies aber Prolin-haltiges als Protokollagen bezeichnetes Polypeptid gebildet. Die Prolinreste werden sodann teilweise durch das Enzym Protokollagen-Prolin-Hydroxylase in Hydroxyprolin umgewandelt (LUKENS, 1965; PROCKOP u. JUVA, 1965; JUVA et al., 1966; KIVIRIKKO u. PROCKOP, 1967 a,b,c).

Nach diesem Mechanismus entstehen sogenannte α -Ketten, die sich nur geringfügig in der Aminosäuresequenz unterscheiden (α_1 , α_2 , α_3) (PIEZ, 1964; HEIDRICH u. WYNSTON, 1965) und von denen sich je drei Ketten zu einer rechtsdrehenden Superhelix verdrillen.

Die Intrazelluläre Kollagenbiosynthese endet mit der Bindung von Kohlenhydratgruppen an die Superhelix und der Ausdifferenzierung des sogenannten neutralsalzlöslichen Tropokollagen

Nach dem Transport des Tropokollagens aus den Fibroblasten kommt es durch Ausbildung von intramolekularen Bindungen innerhalb des Tropokollagens und von intermolekularen kovalenten Bindungen zu einer steigenden Verfestigung der Fibrillen.

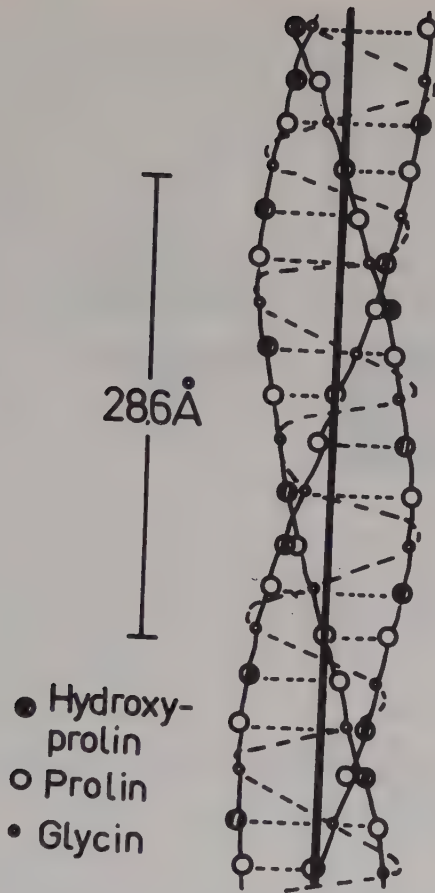


Abb. 1 : Schematische Darstellung der Struktur des Kollagenmoleküls. (n. BUDDECKE, 1971)

Wegen der damit verbundenen Abnahme der Löslichkeit lassen sich verschiedene in NaCl (0,14 Mol/l und 0,45 Mol/l) oder verdünnten Säuren lösliche Kollagenfraktionen unterscheiden: das neu­tralsalzlösliche, das säurelösliche und das unlösliche Kollagen (GREEN u. LOWTHER, 1959; GROSS, 1959; JACKSON u. BENTLEY, 1960).

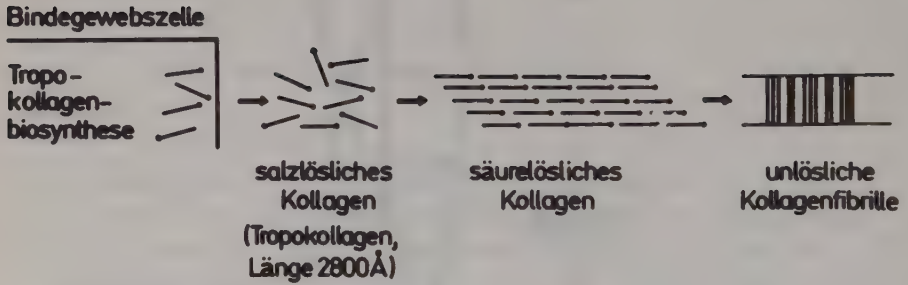


Abb. 2: Extrazelluläre Reifung des Kollagens
(n. BUDDECKE, 1971).

1.1.2. Umsatz, Abbau und Ausscheidung

Als Bestandteil des Mesenchyms unterliegt das Kollagen einem fortwährenden Umsatz.

Das Tropokollagen wird bei seinem Abbau durch spezifische Kollagenasen in zwei Bruchstücke gespalten (NAGAI et al., 1966) und mit Hilfe unspezifischer Proteasen oder spezifischer Kollagenpeptidasen einem weiteren Abbau unterwor-

fen (WOESSNER, 1968). Die hierbei entstehenden Abbauprodukte lassen sich als freies, peptid- und proteingebundenes Hydroxyprolin im Bindegewebe (CHVAPIL u. CMUCHALOVA, 1961; KOBRLE u. CHVAPIL, 1961 a; KIVIRIKKO, 1963; CHVAPIL u. JACKSON, 1964; SCHULZ-HAUDT et al., 1965) und im Plasma nachweisen (KOBRLE u. CHVAPIL, 1961 b; Le ROY et al., 1964; FREY, 1965; KIBRICK et al., 1965).

Da Hydroxyprolin-haltige Kollagenbruchstücke für eine Neusynthese nicht wieder verwendet werden können (CHVAPIL u. JACKSON, 1964; HURYCH u. CHVAPIL, 1965), werden sie entweder auf renalem Wege ausgeschieden oder einem weiteren Katabolismus unterworfen (ADAMS, 1970).

Während das freie Hydroxyprolin fast vollständig in den Tubuli der Niere rückresorbiert wird und damit nur eine niedrige Clearancerate aufweist (PROCKOP et al., 1962; BENOIT et al., 1964; SCRIVER u. GOLDMANN, 1966; BENOIT u. WATTEN, 1968), werden Hydroxyprolin-haltige Peptide schnell über die Niere ausgeschieden (PROCKOP et al., 1962; BENOIT et al., 1964; BENOIT u. WATTEN, 1968).

Aus diesem Grund liegt über 95 % des im Urin enthaltenen Hydroxyprolins in peptidgebundener Form und nur weniger als 5 % als freie Aminosäure vor (ZIFF et al., 1956; PROCKOP u. SMOERDSMA, 1961; KIBRICK et al., 1962; MEILMAN et al., 1963).

Die Zusammenhänge zwischen Kollagenumsatz und Hydroxyprolinausscheidung im Urin konnten durch Isotopenstudien an Ratten geklärt werden (PROCKOP, 1964; KIVIRIKKO et al., 1965; LAITINEN, 1967):

Nur etwa 10 %, der allen drei Kollagenfraktionen entstammenden, Hydroxyprolin enthaltenen Kollagenabbauprodukte werden über die Niere ausgeschieden, so daß erst bei massiven pathologischen Veränderungen des Kollagenstoffwechsels deutlich meßbare Abweichungen der normalen Hydroxyprolinausscheidung auftreten können.

Zur relativen Beteiligung des Kollagens verschiedener Organe an der Hydroxyprolinausscheidung ist zunächst zu bemerken, daß etwa die Hälfte des gesamten Körperkollagens in den Knochen lokalisiert ist (CURTISS, 1963; DULL u. HENNEMAN, 1963; KLEIN et al., 1964). Die Umsatzrate des reifen Kollagens jedoch entspricht denen zahlreicher anderer Gewebe (PROCKOP, 1964; LAITINEN, 1967). Aufgrund der annähernd gleichen Umsatzrate des reifen Kollagens in den verschiedenen Organen kann die Hydroxyprolinausscheidung im Urin nur Aufschluß über die gesamte Stoffwechsellaage geben.

Eine physiologisch erhöhte Hydroxyprolinausscheidung kann sich aufgrund einer gesteigerten Kollagensynthese ergeben, wie sie in der Wachstumsphase des Organismus vorkommt (JASIN et al., 1962), oder durch ein erhöhtes Angebot Hydroxyprolinhaltiger Nahrung wie Gelatine, Fisch oder Fleisch. Um daher bei der Hydroxyprolinbestimmung im Urin Rückschlüsse auf den Kollagenumsatz ziehen zu können, muß eine kollagenarme (kollagenfreie) Diät eingehalten werden (SJOERDSMA et al. 1965). Dagegen ergibt sich eine physiologische Verringerung der renalen Hydroxyprolinausscheidung bei einer Verminderung der Kollagensynthese, wie es bei der Alterung des Organismus der Fall ist (JASIN et al., 1962).

Weitaus wichtiger ist jedoch, daß mit der Hydroxyprolinbestimmung im Urin eine diagnostische Hilfe bei allen Krankheiten, die mit einem pathologischen Kollagenstoffwechsel einhergehen, gegeben werden kann. Zu diesen Krankheiten mit primär oder sekundär systemischer Beeinflussung des Kollagenstoffwechsels gehören vor allem Erkrankungen des Endokriniums, Krankheiten mit relativ starken Veränderungen am Knochen (Le ROY, 1967; LAITINEN, 1975) und Hautkrankheiten (KIVIRIKO, 1970).

Hydroxyprolinausscheidung	erhöht	vermindert
<u>Krankheiten des Knochens und des Bindegewebes:</u>		
Knochentuberkulose	+	
primäre u. sekundäre Knochentumore	+	
Paget Krankheit	+	
Osteogenesis imperfecta	+	
Osteomalazie	+	
Osteoporose		+
Rheumatische Arthritis	+	
Marfan Symptomenkomplex	+	
Knochenbrüche	+	
<u>Hautkrankheiten:</u>		
Psoriasis (erythrodermica, guttata)	+	
Sklerodermie	+	
Dermatomyositis		+
<u>Erkrankungen der endokrinen Drüsen:</u>		
Hyperthyreoidismus	+	
Hyperparathyreoidismus	+	
Gigantismus	+	
Akromegalie	+	
Cushing-Syndrom		+
<u>Andere Krankheiten und Ursachen:</u>		
Erhöhte Kollagenzufuhr	+	
Schwangerschaft	+	
Verbrennungen	+	
Systematischer Lupus erythematodes		+
Polyarteriitis nodosa		+
Leberzirrhose (aktive Phase)	+	
Familiäre Hydroxyprolinämie	+	
Hypoparathyreoidismus		+
Rachitis durch Vitamin-D-Mangel		+
Hypothyreoidismus	unregelmäßig	
primäre Wachstumsstörungen z.B. durch Hypophysenunterfunktion		+
sekundäre Wachstumsstörungen z.B. bei Kwashiorkor, Unterernährung, chron. Nierenkrankheiten, Stoffwechselstörungen		+

Tab. 2 : Veränderungen der Hydroxyprolinausscheidung im Urin

Neben der Ausscheidungs- menge von Hydroxyprolin im 24-Stunden-Urin unter Berücksichtigung des Alters und einer kollagen-freien Diät kommt dem proteingebundenen Hydroxyprolin im Serum eine große Bedeutung als Parameter des Kollagenstoff-wechsels zu (KEISER et al. 1963). Bei weitgehender Unabhän- gigkeit von Alter und Ernährung ist bei progredient verlau- fenden Krankheiten wie z.B. der Lymphogranulomatose oder bestimmten Nierenerkrankungen ein deutlicher Anstieg des proteingebundenen Hydroxyprolins festzustellen (Le ROY u. SJOERDSMA, 1965).

1.2. Methoden zur Hydroxyprolinbestimmung

Zur Bestimmung von Hydroxyprolin wurden verschiedene Verfah- ren entwickelt, die auf der Reaktion des durch Oxidation von Hydroxyprolin gebildeten Pyrrols mit Isatin, Ninhydrin und p-Dimethylaminobenzaldehyd (p-DAB) beruhten.

Von diesen Methoden erwies sich die Farbkomblexbildung mit p-DAB nach NEUMANN und LOGAN (1950) wesentlich empfindlicher als die übrigen Methoden und wurde zum Ausgangspunkt einer großen Zahl von Modifikationen durch andere Autoren (Le ROY 1967). Ergaben sich anfangs sehr große Schwierigkeiten durch fehlende Reproduzierbarkeit voneinander abweichende Eichkurven oder instabile Farbkomblexe (JACKSON u. CLEARY, 1967), wurde die Bestimmungsmethode durch Einführung des Oxidationsmittels p-Toluolsulfonchloramid-Natrium (Chloramin-T) doch entschei- dend verbessert (STEGEMANN, 1958).

Nach der Oxidation des Hydroxyprolins mittels Chloramin-T in einem schwach sauren Puffer von pH 6 wird die Probe mit Perchlorsäure angesäuert und damit sowohl überschüssiges Chlor- amin-T zerstört, als auch die nachfolgende Reaktion mit p-DAB

vorbereitet.

Nach STEGEMANN (1958) ergeben sich durch Mg-, Ca- oder Ba-Ionen und bei den praktisch vorkommenden Konzentrationen von Tyrosin und Tryptophan im Gegensatz zu anderen Verfahren keine Störungen in der Bestimmungsmethode.

Obwohl sich das Verfahren als sehr empfindlich bei reinen Hydroxyprolinlösungen erwies, stößt man bei der Bestimmung in biologischen Proben auf Schwierigkeiten. Neben reduzierenden Substanzen, durch die der Oxydationsschritt unvollständig bleiben kann, ist mit unspezifischen Chromogenen zu rechnen (STALDER, 1965). Diese absorbierenden Substanzen können z.B. im Plasma bis zu 25 % der insgesamt gemessenen Absorption ausmachen (HUTTERER u. SINGER, 1960).

Es wurde daher versucht, das Bestimmungsverfahren durch Abtrennung der störenden Begleitsubstanzen zu verbessern. PROCKOP und UDENFRIEND (1960) versuchten als erste unspezifische Chromogene durch Extraktion mit Toluol zu entfernen und nach Bildung des Farbkomplexes die Spezifität durch dessen Extraktion zu erhöhen.

Die meisten Autoren sind jedoch der Auffassung (Tab.3), daß nur eine Chromatographie oder eine Vorbehandlung mit Ionenaustauschersäulen interferierende Substanzen genügend zuverlässig entfernen. Andere Methoden zur Hydroxyprolinbestimmung im Urin wie die Isotopenverdünnung (KEISER et al., 1963; STANLEY et al., 1966) oder enzymatische Verfahren (ROSANO, 1966, LAMPERT, 1969) haben sich für die Routinediagnostik nicht durchsetzen können.

Lediglich einige automatisierte Bestimmungsverfahren (GRANT, 1964; DREUX u. LEYMARIE, 1968; JONES et al., 1970; PENNOCK et al., 1970; BANNISTER and BURNS, 1970; SEYMOUR u. JACKSON, 1974; ORLOFF et al., 1975) haben in letzter Zeit an Bedeutung gewonnen.

I.	Destillation von Hydroxyprolin-oxidationsprodukten.	LANG, 1933; WALDSCHMIDT-LEITZ and AKABORI, 1934; WISS, 1949; MITOMA et al., 1959; SERAFINI-CESSI and CESSI, 1964; MÜHLBACH et al., 1966; DUPONT, 1967
II.	Extraktion von Hydroxyprolin-oxidationsprodukten	MITOMA et al., 1959; PROCKOP and UDENFRIEND, 1960; GOLL et al., 1963; PILIC and TITAEV, 1963; LAITINEN et al., 1966; KIVIRIKKO et al., 1967; HOWELLS and WHITEHEAD, 1967; SWITZER and SUMMER, 1971; BLUMENKRANTZ and ASBOE-HANSON, 1973.
III.	Extraktion unspezifischer Chromogene	PROCKOP and UDENFRIEND, 1960; HUTTERER and SINGER, 1960; WOESSNER, 1961; HANSON and WIEDERANDERS, 1969; PAREKH and JUNG, 1970.
IV.	Chromatographische Verfahren:	MYHILL and JACKSON, 1963; TITAEV, 1963; GRAY et al., 1964; MARCUCCI and MUSSINI, 1965; MASKALERIS et al., 1966
	a) Papier- oder Dünnschichtchromatographie	NICHOLLS et al., 1963; BLAU and DABRE, 1965; MUSSINI and MARCUCCI, 1965; MEE, 1973; GIBBS et al., 1974.
	b) Gaschromatographie	COVERDE and VEENKAMP, 1972; BURKHARDT et al., 1973; WALSERAND-SCHOENENBERGER, 1974; ORLOFF et al., 1975.
	c) Kationenaustauscher	ROGERS et al., 1954; PIEZ et al., 1956; ALEXEENKO and OREKHOVICH, 1960; LEACH, 1961; PARTIDGE and ELSDEN, 1961; CUCCO, 1962; MEIWMANN et al., 1963; LE ROY et al., 1964; SATWEKAR et RADHAKRISHNAM, 1964; STALDER, 1965; FIRSCHEIN and SHILL, 1965; LE ROY et al., 1966; STEGEMANN and STALDER, 1967; BOREL et al., 1967; MORSCHES et al., 1967; HANSON and WIEDERANDERS, 1969; ARNOLD et al., 1969; KOEVOET and BAARS, 1969; CALLAHAN et al., 1972; TOMASZESKI, 1971; KIBRICK et al., 1973; CLEARY and SAUNDERS, 1974.
	d) Säulenchromatographie	

Tab. 3: Abtrennung störender Begleitstoffe aus biologischem Material bei der Hydroxyprolinbestimmung.

2. P r o b l e m s t e l l u n g

Die zahlreichen zur Zeit bekannten Verfahren zur Bestimmung von Hydroxyprolin aus biologischen Proben lassen sich im wesentlichen alle auf die folgenden Reaktionsschritte zurückführen:

1. Saure oder alkalische Hydrolyse der zu untersuchenden Probe.
2. Abtrennung von störenden Begleitkomponenten.
3. Photometrische Bestimmung des Hydroxyprolins in der gereinigten Probe.
 - a) Oxidation von Hydroxyprolin zu Pyrrol-2-carbonsäure.
 - b) Decarboxylierung der Pyrrol-2-carbonsäure zu Pyrrol.
 - c) Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (p-DAB) und Bildung eines roten Farbkomplexes.
 - c) Messung der Extinktion des Farbkomplexes bei 560 nm und Vergleich mit einer Eichkurve.

Bei der routinemäßigen Bestimmung von Hydroxyprolin ergeben sich aber immer wieder Schwierigkeiten infolge ungenügender Farbentwicklung oder Überlagerung des Absorptionsspektrums durch unspezifische Chromogene, die hauptsächlich in einer ungenügenden Reinigung von störenden Begleitstoffen begründet liegen. So wird der störende Einfluß von Harnstoff, Ammoniumchlorid, Glucose, Mannit (KOEVOET u. BAARS, 1969; MITCHEL u.

TAYLOR, 1970) und hohen NaCl-Konzentrationen (WOESSNER, 1961) auf die Farbkomplexbildung beschrieben.

In Hinblick auf diese Problematik in der Hydroxyprolinbestimmung soll in der vorliegenden Arbeit die Abtrennung störender Komponenten aus dem Urin anhand verschiedener Methoden untersucht werden.

Besonders berücksichtigt werden soll dabei auch der eventuell entstehende Verlust an Hydroxyprolin und die mit den verschiedenen Methoden erreichbare Empfindlichkeit.

Als Maßstab für die erreichte Reinigung dient die Abweichung der aus dem Urin gewonnenen Absorptionsspektren vom Spektrum des p-DAB-Pyrrol-Farbkomplexes.

Soweit sich bei den zu untersuchenden Verfahren eine Trennung von Reinigungs- und Bestimmungsgang durchführen läßt, wird der Hydroxyprolingehalt der besseren Vergleichsmöglichkeit wegen mit einer modifizierten Bestimmungsmethode nach STEGEMANN (1958) ermittelt (WATERMANN, 1978). Sind die Reaktionsschritte zur Abtrennung oder Extraktion störender Begleitstoffe aber in den Bestimmungsgang integriert, soll die vom Autor angegebene Hydroxyprolinbestimmungsmethode angewendet werden.

Die allen Bestimmungen im Urin vorausgehende Freisetzung von peptidgebundenem Hydroxyprolin durch saure Hydrolyse soll, um die Vergleichsmöglichkeit zu erhöhen, ebenfalls nach derselben Methode in HCl (6 Mol/l) vorgenommen werden. Die optimale Hydrolysetemperatur und Hydrolysedauer soll in einer ersten Untersuchung ermittelt werden.

3. Experimenteller Teil

3.1. Untersuchungen zur Hydrolyse

Die in der Literatur angegebenen Hydrolysevorschriften schreiben zur Peptidaufspaltung im Urin verschiedene Temperaturen und Einwirkungszeiten vor. Im Gegensatz zur Hydrolyse von peptidgebundenem Hydroxyprolin im Plasma, wird im Urin bei fast allen Autoren (Ausnahme: MITOMA et al., 1959) die sogenannte saure Hydrolyse in HCl (6 Mol/l) durchgeführt.

Es wurde die Abspaltung des peptidgebundenen Hydroxyprolins im Urin bei den im Schrifttum überwiegend verwendeten Temperaturen von 100°, 115° und 135° C in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Dazu wurde aus gesammeltem 24-Stunden-Urin 2 ml Urin und 2 ml HCl konz. vermischt und in verschraubbaren Röhrchen mit Gummistopfen bei den verschiedenen Temperaturen hydrolysiert. Nach jeder vollen Stunde wurde für einen Teil der Röhrchen der Hydrolysevorgang beendet und nach 2 - 3 Min. Abkühlen die Reinigung von störenden Komponenten nach STALDER (s.3.2.1.) abgeschlossen. Der Gehalt an Hydroxyprolin in den gereinigten Proben wird in Dreifachbestimmungen mit der modifizierten Bestimmungsmethode nach STEGEMANN (s. 3.2.5.) colorimetrisch bestimmt.

3.2. Auswahl der Trennmethoden

Aus der Vielzahl der beschriebenen Methoden (Tab.3) zur Abtrennung von störenden Begleitstoffen wurden 5 Methoden ausgewählt, die nach Ansicht der Autoren einen hohen Reinigungseffekt erwarten lassen und dabei von hoher Spezifität bezüglich des zu bestimmenden Hydroxyprolins sind:

- 3.2.1. STALDER (1965)
- 3.2.2. Le ROY et al. (1964)
- 3.2.3. FIRSCHEIN u. SHILL (1966)
- 3.2.4. GOVERDE u. VEENKAMP (1972)
- 3.2.5. STEGEMANN (1958)
- 3.2.6. KIVIRIKKO et al. (1967)

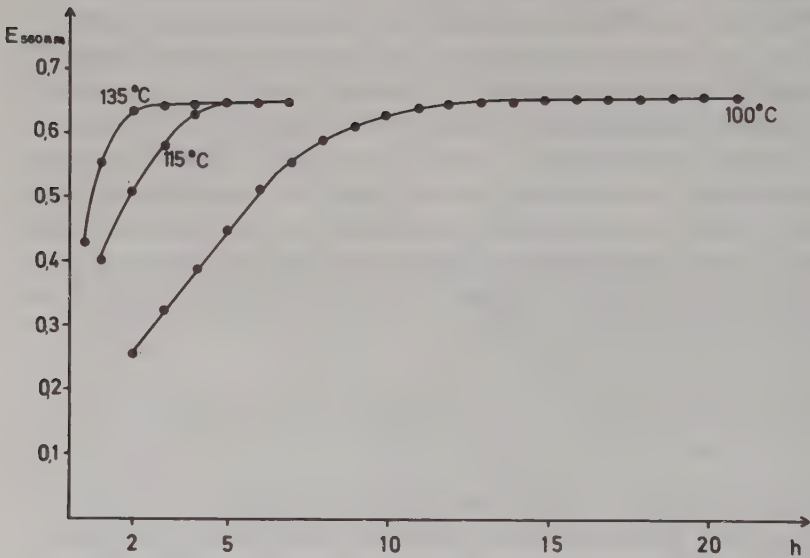


Abb. 3: Abhängigkeit von Temperatur und Zeit bei der Hydrolyse auf die Extinktion bei 560 nm.

3.2.1. Abtrennung von Störfaktoren nach STALDER (1965)

Prinzip

Zur Anwendung kommen zwei Ionenaustauschersäulen, vor (Amberlite IRA 410, OH^-) und (Dowex 50 w X 8, H^+ , 200-400 mesh) nach der Hydrolyse des zu untersuchenden Harns. Wir beschränken uns auf die Untersuchung von Ionenaustauschersäulen nach erfolgter Hydrolyse.

Arbeitsvorschrift

Alle Reagenzien sind, wenn nicht anders vermerkt, p.a.-Substanz der Firma Merck.

Nach Hydrolyse des Urins in HCl (6 Mol/l) wird 2 ml des Hydrolysates in einem Rotationsverdampfer (bei 60°C) vollständig eingedampft und anschließend in 5 ml aqua dest. aufgelöst. Das Austauscherharz (Dowex 50 w X 8, H^+ , 200-400 mesh) wird nacheinander 1. mit dem 10-fachen Volumen NaOH (6 Mol/l), 2. mit aqua dest. bis der pH-Wert des Waschwassers 7 beträgt, 3. mit dem 10-fachen Volumen HCl (6 Mol/l) und 4. wieder mit aqua dest. bis der pH-Wert des Waschwassers 5 beträgt gewaschen. Eine Chromatographiesäule mit einem Innendurchmesser von 0,8 cm wird mit dem aufbereiteten Harz bis zu einer Höhe von 7 cm gefüllt und die Säulenfüllung vor Gebrauch mit 20 ml HCl (1 Mol/l) äquilibriert.

Die Probe (5 ml) wird mit 1 g Aktivkohle geschüttelt und zentrifugiert. In Abweichung von der Arbeitsvorschrift nach STALDER wird der größeren Genauigkeit wegen vom Überstand nur ein aliquoter Teil (4 ml) des Überstandes abgezogen und auf die aktivierte Säule gegeben. Nach dem Durchlaufen der Probe wird die Säule mit 20 ml aqua dest. gewaschen. Die Elution des Hydroxyprolins erfolgt anschließend mit 30 ml einer Ammoniaklösung (1 Mol/l). Nach Abdampfen des Ammoniaks in einem Rotationsverdampfer bei 50°C , wird der Rückstand mit 20 ml aqua dest. aufgenommen und die Bestimmung des Hydroxyprolins durchgeführt.

3.2.2. Abtrennung von störenden Komponenten nach Le ROY et al. (1964)

Prinzip

Bei Le ROY kommt ebenfalls eine Ionenaustauschersäule (50 w X 8, H^+ , 200 - 400 mesh) mit den Abmessungen 1 x 5 cm zur Anwendung.

Arbeitsvorschrift

2 ml hydrolysierten Urin wird in einem Rotationsverdampfer bei $60^{\circ}C$ von der Salzsäure befreit. Anschließend wird der Rückstand in 8 ml aqua dest. aufgenommen und von Chromogenen mit 1 g Aktivkohle befreit. Nach Zentrifugation werden 7 ml vom Überstand auf die mit 20 ml HCl (1 Mol/l) äquilibrierte Säule gegeben und mit 5 ml HCl (1 Mol/l) nachgewaschen. Das entsprechende Eluat wird verworfen. Schließlich wird mit 20 ml HCl-Lösung (1 Mol/l) das Hydroxyprolin eluiert und nach erneutem Eindampfen in einem Rotationsverdampfer bei $60^{\circ}C$ in 20 ml aqua dest. gelöst.

3.2.3. Isolierung des Hydroxyprolins nach FIRSCHEIN u. SHILL (1966)

Prinzip

FIRSCHEIN und SHILL beschreiben eine chromatographische Methode zur Abtrennung von störenden Komponenten. Dabei wird die unterschiedliche Geschwindigkeit mit der Hydroxyprolin und die störenden Begleitstoffe entlang den Partikeln einer Chromatographiesäule wandern, zur Isolierung von Hydroxyprolin ausgenützt.

Arbeitsvorschrift

Reagenzien:

Citratpuffer, 0,1 Mol/l, pH 6,0

- A. 58,8 g Na-citrat x 2H₂O wird in 2 Liter aqua dest. gelöst.
- B. 19,2 g Citronensäure wird aufgelöst in 1 Liter aqua dest.
150 ml dieser Lösung werden zu 2 Liter Na-citrat-Lösung zugegeben und der pH-Wert auf 6,0 eingestellt.

Dowex 50 w X 8, H⁺, 200 - 400 mesh.

Eine Chromatographiesäule mit einem Innendurchmesser von 0,8 cm wird mit dem präparierten Harz (s. 3.2.1.) bis zu einer Höhe von 14 cm gefüllt. Die Säule wird mit Citratpuffer (0,1 Mol/l) äquilibriert bis der aus der Säule tropfende Puffer ebenfalls den pH-Wert von 6,0 aufweist.

1 ml hydrolysierter und gefilterter Urin wird direkt auf die Säule gegeben und mit 1 ml Puffer nachgespült. Schließlich wird durch konstante Zugabe von Citratpuffer eine Flußrate von 20 - 30 ml pro Stunde eingestellt. Nach FIRSCHEIN und SHILL soll bei den meisten Säulen das gesamte Hydroxyprolin in der 20 bis 25 ml Fraktion des Eluates austreten.

3.2.4. Die Bestimmungsmethode nach GOVERDE und VEENKAMP (1972)

Prinzip

Freies und peptidgebundenes Hydroxyprolin werden an einen stark sauren Ionenaustauscherharz in Tablettenform (Hypronosticon-

blette der Firma Organon) adsorbiert. Nach Extraktion von störenden Komponenten mittels 10 ml aqua dest. wird erst Jetzt die Hydrolyse des an die Harzpartikel adsorbierten peptidgebundenen Hydroxyprolins durchgeführt. Anschließend wird das Jetzt -freie Hydroxyprolin durch Neutralisation von den Partikeln abgelöst und kann in den Bestimmungsgang eingehen.

Arbeitsvorschrift

Reagenzien:

Die Reagenzien werden in einer Testpackung (Hypronosticon-Test) der Firma Organon geliefert:

Ionenaustauscherharz "Amberlite" CG 120 II, 200 - 400 mesh, H-Form Tabletten aus Je 250mg Harz mit Zusatz von Binde- und Füllsubstanzen.

Oxidationslösung aus 1375 mg Chloramin-T, gelöst in 100 ml Acetat-Citrat-Puffer pH 6.

Farbreagenz. 24 g p-Dimethylaminobenzaldehyd, in 36 ml 60 bis 62 % Perchlorsäure aufgelöst und mit 2-Propanol auf 330 ml aufgefüllt.

Haltbarkeit wenige Stunden.

Zu einer Tablette wird 0,5 ml Urin pipettiert. Die Röhrchen werden auf 10 ml mit aqua dest. aufgefüllt, kräftig geschüttelt und 5 Min. bei 2000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Anschließend werden die Röhrchen mit Gummistopfen und Schraubverschluß fest verschlossen und bei 100° C 16 Stunden hydralysiert.

Nach Abkühlen und Zufügen von 1 Tropfen 1 % Phenolphthalein-Lösung wird NaOH (2 Mol/l) tropfenweise zugegeben, bis die Farbe auch nach Schütteln nicht mehr verschwindet. Die Probe wird nun genau auf 2,5 ml aufgefüllt, geschüttelt und zentrifugiert. Zu 0,5 ml des Überstandes wird 1 Tropfen HCl (1 Mol/l) zugegeben, so daß die Farbe verschwindet. Nach Zugabe von 1 ml 2-Propanol und 0,5 ml Oxidationslösung wird die Probe 3 Min. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend wird 10 ml der Farbreaenz zugefügt und 25 Min. bei 60° C im Wasserbad erhitzt. Die Extinktion kann nach Abkühlen der Probe und 30 Min. nach Wasserbadentnahme bei 560 nm gemessen werden.

Zum besseren Vergleich des Reinigungseffektes wird, in Abänderung der oben angegebenen Originalvorschrift, nach Neutralisation auf 10 ml aufgefüllt und wie bei den unter 3.2.1. und 2. beschriebenen Methoden die modifizierte Bestimmungsmethode nach STEGEMANN (1958) angewendet.

3.2.5. Arbeitsvorschrift für die modifizierte Hydroxyprolinbestimmung nach STEGEMANN (1958)

Reagenzien:

- A. Chloramin-T-Lösung 0,05 Mol/l
1,41 g Chloramin-T
20 ml aqua bidest.
30 ml n-Propanol
mit Acetat-Citrat-Puffer pH 6 auf 100 ml auffüllen
(Die Lösung ist am Gebrauchstag anzusetzen)
- b. p-DAB-Perchlorsäurelösung:
20 g p-DAB werden kurz vor Gebrauch in 27 ml 70 % Perchlorsäure gelöst und mit n-Propanol auf 100 ml aufgefüllt.

Analysengang:

2 ml Probe werden mit 1 ml Chloramin-T-Lösung versetzt, kurz geschüttelt und 20 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird 1 ml frisch angesetzte Perchlorsäurelösung hinzugegeben und geschüttelt. Schließlich wird im Wasserbad bei 60° C 20 Min. lang erhitzt und danach 2 - 3 Min. in kaltem Wasser abgekühlt. Die Extinktionsmessung kann 10 - 15 Min. nach Wasserbadentnahme bei 560 nm erfolgen. Der Farbkomplex ist ungefähr 40 Min. stabil.

3.2.6. Extraktion von störenden Begleitstoffen nach KIVIRIKKO et al., (1967)

Prinzip

Das Besondere dieses Verfahrens besteht darin, daß die Reaktionsschritte zur Extraktion störender Komponenten in den Bestimmungsgang integriert sind. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, daß Hydroxyprolin in organischen Lösungsmitteln wie Toluol unlöslich ist, das aus Hydroxyprolin bei der Oxidation entstehende Pyrrol sich aber in das organische Medium überführen läßt. Dadurch läßt sich in bestimmten Phasen des Bestimmungsgangs eine Extraktion von störenden Komponenten beziehungsweise des Pyrrols erreichen.

Arbeitsvorschrift

Reagenzien:

Kaliumboratpuffer, pH 8,7.
61,84 g Borsäure und 225 g KCl werden in 800 ml aqua dest. gelöst. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 8,7 mit KOH (10 Mol/l und 1 Mol/l) wird auf 1000 ml aufgefüllt.

Alaninlösung:

10 mg Alanin werden in 90 ml aqua dest. gelöst, mit KOH auf pH 8,7 eingestellt und auf 100 ml aufgefüllt.

Chloramin-T-Lösung, 0,2 Mol/l:

5,6 g Chloramin-T werden in 100 ml Methylcellulose gelöst. Die Lösung ist täglich frisch anzusetzen.

Natriumthiosulfatlösung, 3,6 Mol/l:

89,3 g werden auf 100 ml mit aqua dest aufgefüllt.

p-Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlich's Reagenz):

27,4 ml konz. Schwefelsäure wird langsam zu 200 ml absolutem Äthanol gegeben und gekühlt. 120 g p-Dimethylaminobenzaldehyd wird in einem anderen Gefäß zu 200 ml absolutem Äthanol gegeben. Beide Lösungen werden in einem Eisbad miteinander vermischt

1 ml Urin wird mit 1 ml HCl konz. versetzt und in verschlossenen Röhrchen über Nacht (16 Stunden, 100° C) hydrolysiert. Mit 1 Tropfen Phenolphthalein und KOH (12,1 und 0,1 Mol/l) wird auf rosa Farbe eingestellt und auf exakt 15 ml mit aqua dest. aufgefüllt. Die Röhrchen werden anschließend geschüttelt und 5 Min. bei 2000 U/Min. zentrifugiert.

Ein 3 - 12 µg Hydroxyprolin enthaltender Anteil (2 ml) wird auf 4 ml mit aqua dest. verdünnt und mit 1 Tropfen Phenolphthalein und KOH und HCl (0,1 und 0,05 Mol/l) erneut auf schwach rosa Farbe eingestellt. Nach Absättigen der Probe mit ungefähr 3 g KCl wird 0,5 ml Alaninlösung

und 1 ml Kaliumboratpuffer unter Schütteln zugegeben. Anschließend werden die Proben bei Raumtemperatur 20 - 30 Min. stehengelassen.

Die Oxidation wird durch Zugabe von 1 ml Chloramin-T-Lösung (0,2 Mol/l) eingeleitet. Nach erneutem Schütteln bleibt die Probe 25 Min. bei Raumtemperatur stehen und wird hiernach mit 3 ml Natriumthiosulfatlösung (3,6 Mol/l) versetzt.

Zur Extraktion störender Komponenten werden genau 5 ml Toluol zugegeben, die Röhrchen mit Stopfen verschlossen und 5 Min. geschüttelt.

Nach Zentrifugieren bei 1000 U/Min. wird die organische Phase vollständig abgezogen und verworfen.

Die Röhrchen werden wieder fest verschlossen und für 30 Min. in ein Wasserbad von 100 C⁰ gestellt. Anschließend werden die Röhrchen unter Leitungswasser abgekühlt. Genau 5 ml Toluol werden zugesetzt und 5 Min. geschüttelt. Anschließend wird kurz bei 1000 U/Min. zentrifugiert und 2,5 ml der organischen Phase in neuen Röhrchen mit 1 ml Ehrlich's Reagenz vermischt. Nach 30 Min. kann die Extinktion bei 560 nm gemessen werden.

3.3. Überprüfung der Trennmethode

3.3.1. Elution des Hydroxyprolins

Um bei den Verfahren nach STALDER (1965) und FIRSCHEIN u. SHILL (1966) (s.3.2.) den genauen Austritt des Hydroxyprolins zu bestimmen, wird anstelle des hydrolysierten Urins einer Hydroxyprolinstandardlösung (20 ug/ml), eine definierte Menge H³-markiertes Hydroxyprolin zugegeben. In 2 bzw. 10 ml Anteilen des Eluates und des Waschwassers wird die Aktivität in einem β -Counter gemessen und damit das Auftreten von Hydroxyprolin angezeigt.

3.3.1.1. Methode nach STALDER (1965)

Gemessen wird die Aktivität im Waschwasser und Eluat in 10 ml Fraktionen.

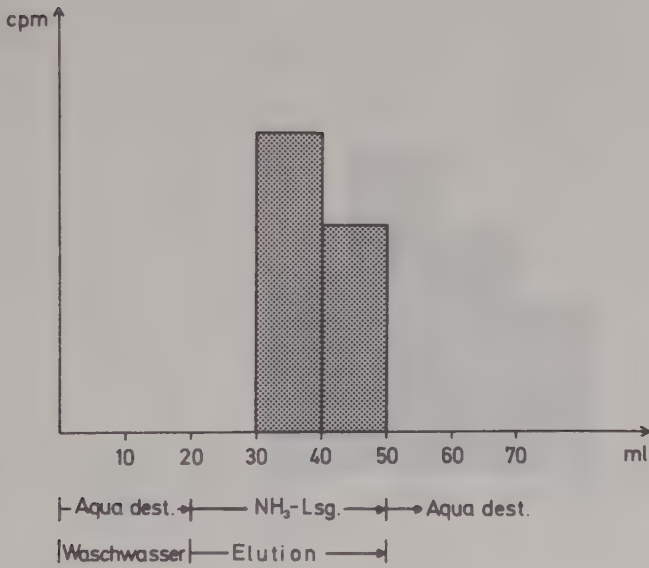


Abb. 4 : Auftreten von H^3 -markiertem Hydroxyprolin im Waschwasser und Eluat.

3.3.1.2. Methode nach FIRSCHEIN und SHILL (1960)

Das auslaufende Eluat wird in 2 ml Anteilen aufgefangen und die Aktivität in jeder Fraktion gemessen.

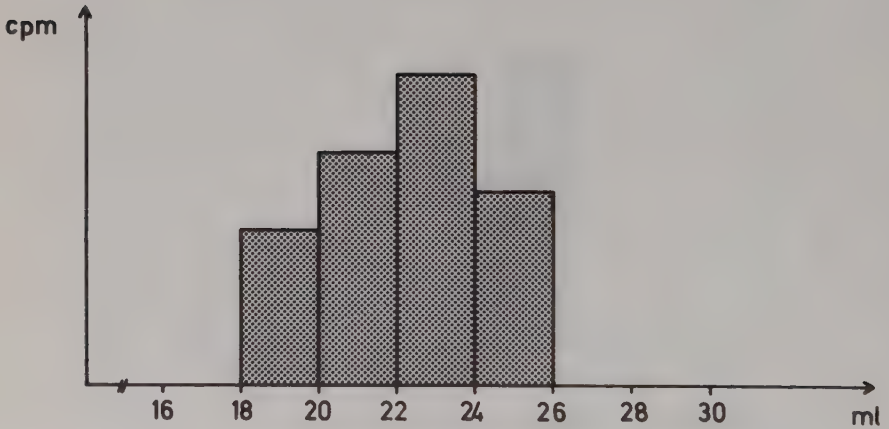


Abb. 5 : Auftreten von H^3 -markiertem Hydroxyprolin im Eluat.

H^3 -markiertes Hydroxyprolin tritt in der 18 bis 24 ml Fraktion aus (s. Abb. 5) und ist damit in 8 ml Elutions-

flüssigkeit enthalten. Zur Untersuchung der Frage, ob Hydroxyprolin bei allen Säulen in der 18 bis 24 ml Fraktion enthalten ist, wird das Austrittsvolumen an 10 verschiedenen Säulen bestimmt (s. Tab. 4).

Hydroxyprolin			
Säule Nr.	von ml	bis ml	gesamt ml
I	19	27	8
II	16	24	8
III	18	24	6
IV	12	20	8
V	10	20	10
VI	16	24	8
VII	14	22	8
VIII	18	24	6
IX	14	24	10
X	18	26	8

Tab. 4 : Austrittsvolumen von H^3 -markiertem Hydroxyprolin an 10 Säulen.

Aufgrund der Ergebnisse in Tab. 4 kann die Elution von Hydroxyprolin in einem Bereich von 10 bis 27 ml erfolgen. Damit ist es notwendig 17 ml Eluat zu sammeln und der Hydroxyprolinbestimmung zuzuführen.

3.3.2. Wiederfindungsraten

Die zur Abtrennung störender Begleitstoffe aus dem Urin notwendigen Reaktionen sind mit einem unvermeidlichen Verlust von Hydroxyprolin verbunden. Zur Messung dieses Verlustes wird die sog. Wiederfindungsrate bestimmt.

Dazu wird anstelle der unter 3.2.1. - 4. angegebenen Urinmengen die entsprechende Menge Hydroxyprolinstandardlösung (20 μ l) mit einer definierten Menge H^3 - Hydroxyprolin eingesetzt und die Aktivität dieser Probe gemessen (Gesamtaktivität). Nach Ablauf der verschiedenen Reinigungsverfahren wird in den gereinigten Proben die wiedergefundene Aktivität, und damit die Wiederfindungsrate zugesetzten Hydroxyprolins bestimmt.

Die Bestimmung des Hydroxyprolinverlustes bei dem Toluol-extraktionsverfahren nach KIVIRIKKO et al. (1967) (3.2.5.) erfolgt durch Messung der zu einer Standardlösung zugegebenen Aktivität vor und nach der Extraktion mit 5 ml Toluol.

3.3.3. Vergleich der Absorptionsspektren

Bei den folgenden Untersuchungen sollen die nach den verschiedenen Verfahren (3.2.1., 2.4.5.) aus dem Urin gewonnenen Absorptionsspektren mit dem Absorptionsspektrum des Pyrrol-p-DAB-Farbkomplexes verglichen werden. Um das Absorptionsspektrum des Pyrrol-p-DAB-Farbkomplexes zu er-

mitteln, werden Hydroxyprolinstandardlösungen (1,2,4 und 6 ug/2 ml) nach Vorschrift (3.2.5.1.) analysiert und die Extinktion in einem Meßbereich von 440 bis 700 nm mit einem Spektralphotometer (DMR 10 der Firma Zeiss) in 1 cm Glas-
küvetten in Abhängigkeit von der Wellenlänge gemessen.

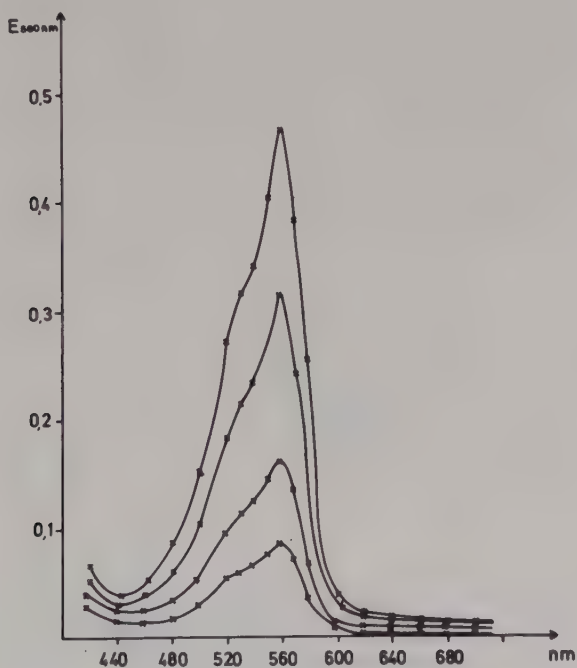


Abb. 6 : Graphische Darstellung des Absorptionsspektrums verschiedener Hydroxyprolinstandardlösungen.

Probe	STALDER			Le ROY et al.			FIRSCHEIN u. SHILL			GOVERDE u.		KIVIRIKKO et al.
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	VEENKAMP		
1	95,9	94,8	95,4	97,4	99,7	91,5	85,2	80,2	94,8	95,6	93,8	97,9 95,7
2	96,6	92,6	93,4	88,9	95,6	97,0	91,5	97,4	87,3	96,6	94,5	97,8 96,3
3	93,8	95,1	95,2	97,5	92,5	96,0	87,7	92,0	90,9	94,2	96,0	98,1 98,0
4	95,2	96,9	92,8	89,8	98,3	94,2	97,5	84,8	94,6	96,3	92,9	96,9 96,2
5	94,1	94,0	94,3	93,4	93,6	91,8	82,9	90,2	88,7	94,9	96,2	97,8 97,0
6	94,9	93,9	92,0	96,3	97,2	90,9	84,2	92,6	85,2	97,2	94,7	98,2 95,9
7	92,6	94,8	92,2	91,7	93,8	95,7	93,7	84,3	97,0	95,0	95,2	97,7 96,3

MW:	94,23	94,47	89,65	95,22	97,13
s ±	1,36	2,94	5,14	1,18	0,90
V	1,44 %	3,11 %	5,73 %	1,24 %	0,93 %

Tab. 5 :
Wiederfindungsraten von H³-Hydroxyprolin in Prozent.

Um den Reinigungseffekt der verschiedenen Verfahren vergleichen zu können, wird der 24-Stunden-Urin eines Probanden bei normaler Kost gesammelt und mit den zu untersuchenden Reinigungsverfahren (3.2.1., 2., 4., 5.) von störenden Komponenten befreit. Bei einem Teil der Proben wird die Reinigung unterlassen und der Gehalt an Hydroxyprolin im entsprechend verdünnten Urin bestimmt.

Außer bei dem Verfahren nach KIVIRIKKO et al. (1967) wird zur eigentlichen Hydroxyprolinbestimmung die modifizierte Bestimmungsmethode nach STEGEMANN (1958) (3.2.4.1.) angewendet. Da bei der Methode nach KIVIRIKKO et al. (1967) die Reinigungsschritte direkt in den Bestimmungsgang eingefügt sind, läßt sich eine Trennung von Reinigung und Bestimmungsmethode nicht durchführen. Es wird deshalb die vom Autor selbst angegebene Bestimmungsmethode (3.2.5.) verwendet.

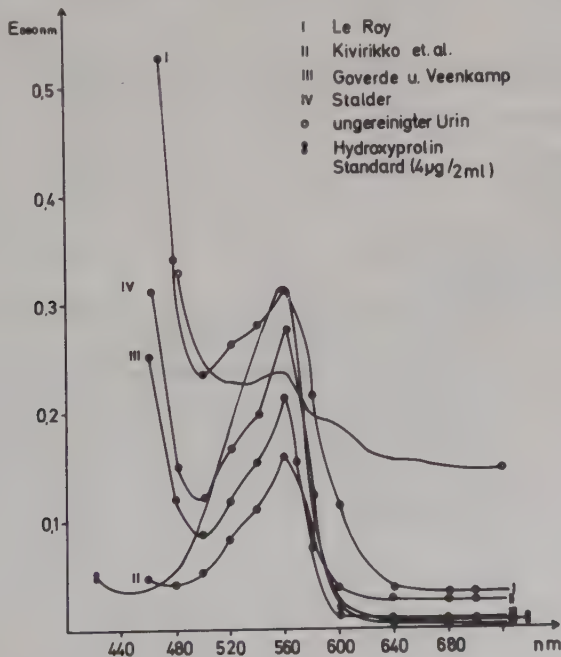


Abb. 7 : Graphische Darstellung des Absorptionsspektrums aus einem 24-Std.-Urin bei verschiedenen Reinigungsverfahren

3.3.4. Extinktionsvergleich

Um die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der verschiedenen Methoden zu vergleichen, werden 15 Hydroxyprolinbestimmungen aus dem gleichen 24-Stunden-Urin unter möglichst konstanten Versuchsbedingungen nach Vorschrift in 3.2.1., 4., 5. durchgeführt und sowohl Variationskoeffizient als auch Standardabweichung ermittelt. Der nach GOVERDE und VEENKAMP (1972) gereinigte Urin wird 1. mit der modifizierten Bestimmungsmethode nach STEGEMANN (1958) (3.2.4.1.) und 2. mit der vom Autor selbst angegebenen Bestimmungsmethode analysiert.

Methode	Mittelwert $\bar{x}$	Standardabweichung s +/-	Variationskoeffizient v
STALDER	0,312	0,0065	2,08 %
KIVIRIKKO	0,132	0,0064	4,85 %
GOVERDE u. VEENKAMP	0,148	0,0068	4,59 %
GOVERDE u. VEENKAMP mit modif. Bestimmungsmethode nach STEGEMANN	0,203	0,010	4,93 %

Tab. 6 : Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient der Extinktionen bei Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes in einem 24-Stunden-Urin mit verschiedenen Methoden (Einzelwerte s. Tabelle im Anhang).

Infolge der errechneten Mittelwerte und den in 3.2.1., 4., 5. angegebenen Verdünnungsverhältnissen im Bestimmungsgang läßt sich die mit den verschiedenen Methoden erreichbare Empfindlichkeit vergleichen.

	STALDER	KIVIRIKKO et al.	GOVERDE u. VEENKAMP	GOVERDE u. VEEN- KAMP mit mod. Bestimmungsmethode nach STEGEMANN
einges. Urinmenge	1 ml	1 ml	0,5 ml	0,5 ml
Verdünnung pro ml	1/12,5	1/15	1/10	1/10
Endvolumen	4 ml	5 ml	11,7 ml	4 ml
$\bar{x}$ E 560 nm	0,312	0,132	0,148	0,203
umgerechnete Extinktionen auf 1 ml Urin bei gleicher Verdünnung und gleichem Endvolumen	0,389	0,248	0,433	0,406

Tab. 7 : Eingesetzte Urinmenge, Verdünnungsverhältnisse, Endvolumen der Analyse und Mittelwert der Extinktionen sowie korrigierte Extinktionen bei 560 nm bei verschiedenen Verfahren.

3.3.5. Wiederfindungsraten bei Verwendung von Urin

Um eine mögliche Abweichung von den mit Hydroxyprolin-Standardlösungen gemessenen Ergebnissen (3.2.2. Wiederfindungsrate) bei Verwendung von Urin durch anderes chemisches Verhalten der Probe bei den Reinigungsreaktionen zu ermitteln, werden 10 Analysen aus einem 24-Stunden-Urin mit den Verfahren nach STALDER (1965) und GOVERDE u. VEENKAMP (1972) analysiert. Dem Urin (1 ml bzw. 0,5 ml) wird eine definierte Menge H^3 -Hydroxyprolin zugesetzt und die Gesamtaktivität gemessen.

Bei dem Verfahren nach STALDER (1965) wird die Aktivität der Proben nach Behandlung des von Salzsäure befreiten Hydrolysates mit Aktivkohle und am Ende des Reinigungsvorganges nach Durchlaufen der Säule in 20 ml aqua dest. gemessen. Anschließend wird der Hydroxyprolingehalt wie in 3.2.4.1. mit der modifizierten Bestimmungsmethode nach STEGEMANN (1958) bestimmt.

Zur Messung der Wiederfindungsrate bei der Methode nach GOVERDE u. VEENKAMP (1972) wird die Messung der wiedergefundenen Aktivität in 2,5 ml neutralisiertem und hydrolysiertem Urin vorgenommen und die Hydroxyprolinkonzentration mit der vom Autor angegebenen Methode ermittelt (s.3.2.4.)

3.3.6. pH-Abhängigkeit des Analysenganges

In diesem Untersuchungsabschnitt soll ermittelt werden, inwieweit die Farbentwicklung und damit die Extinktion bei 560 nm vom pH-Wert der gereinigten Probe abhängt.

Dazu wurde die Reinigung eines 24-Stunden-Urins von störenden Begleitstoffen nach GOVERDE und VEENKAMP (1972) und das

saure Hydrolysat mittels NaOH nach Vorschrift (3.2.4.) neutralisiert.

Die gereinigten Proben werden mit HCl (0,1 Mol/l, 0,5 Mol/l, 1 Mol/l, 2 Mol/l und 4 Mol/l) auf verschiedene pH-Werte im Bereich von pH 3 - 10 eingestellt.

Die Messung des pH-Wertes in der Probe erfolgt mit dem pH-Meter pH Digi 510 der Firma WTW.

Proben werden mit der von GOVERDE u. VEENKAMP (1972) angegebenen Bestimmungsmethode analysiert (3.2.4.)

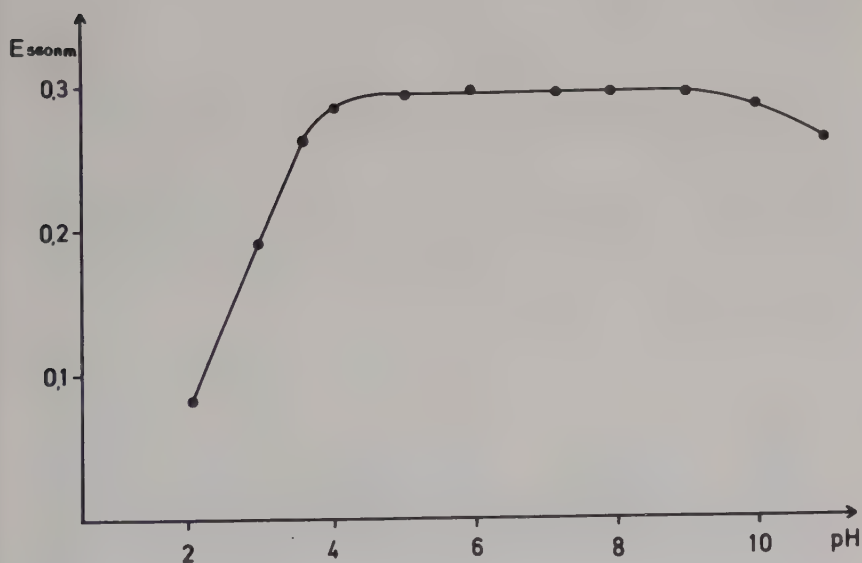


Abb. 8: Abhängigkeit der Extinktion bei 560 nm vom pH-Wert der gereinigten Probe.

säule, Probe	Nach Behandlung		in der gereinigten		E ₅₆₀	nach Reinigung und Neutrali-		E ₅₆₀
	mit Aktivkohle	Probe	Probe			sation	in 2,5 ml	
I	93,5 %		86,3 %		0,310	95,3 %		0,153
II	91,4 %		87,2 %		0,315	96,3 %		0,147
III	93,4 %		86,8 %		0,320	94,2		0,139
IV	94,1 %		84,3 %		0,308	92,9 %		0,149
V	93,1 %		82,3 %		0,308	95,2 %		0,157
VI	92,9 %		88,2 %		0,326	96,9 %		0,159
VII	91,2 %		84,9 %		0,310	93,3 %		0,140
VIII	93,4 %		81,0 %		0,301	95,2 %		0,138
IX	93,9 %		85,0 %		0,312	96,1 %		0,147
X	94,7 %		83,7 %		0,309	92,2 %		0,140
$\bar{x}$	93,12 %		84,97 %		0,312	94,76 %		0,147
s^2	1,17		2,25		0,0073	1,56		0,00765
v	1,26 %		2,65 %		2,34 %	1,65 %		5,20 %

Tab. 8: Wiederfindungsraten und Extinktionen bei Verwendung von Urin.

E r g e b n i s s e

1. Untersuchungen zur Hydrolyse

Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, lassen sich mit den im Schrifttum angegebenen Temperaturen von 100^o, 115^o und 135^o C gleich hohe Maximalextinktionen bei 560 nm erreichen. Aufgrund der alleinigen Zeitabhängigkeit der Hydrolyse müssen folgende Hydrolysezeiten eingehalten werden:

100 ^o C	16 h
115 ^o C	5 h
135 ^o C	3 h

Eine Überschreitung dieser angegebenen Werte um einige Stunden ergibt keine weiteren Änderungen in der Extinktion.

Aus praktischen Gründen hydrolysieren wir bei den nachfolgenden Untersuchungen den Urin über Nacht bei 100^o C in Salzsäure (6 Mol/l).

2. Elution des Hydroxyprolins

4.2.1. Methode nach STALDER (1965)

Bei 10 untersuchten Säulen fand sich jeweils nur in den letzten 20 ml des Elutionsmittels H³-markiertes Hydroxyprolin (3.3.1.1.). Aufgrund dieser Ergebnisse kann in Abänderung der Arbeitsvorschrift von STALDER die erste 10 ml Fraktion des Eluates verworfen werden. Damit ist ein geringerer Zeitaufwand beim anschließenden Abdampfen des Ammoniaks und eine Er-

höhung des Störfaktoren enthaltenen Waschvorlaufs verbunden. Es wird daher bei den folgenden Untersuchungen des Ionenaustauschverfahrens nach STALDER nur 20 ml Eluat gesammelt und der Hydroxyprolinbestimmung zugeführt.

4.2.2. Methode nach FIRSCHEIN und SHILL (1966)

Die Untersuchungen zu dieser Methode dagegen ergaben, daß sich trotz konstanter Bedingungen kein konstanter Austritt des Hydroxyprolins erreichen läßt. Markiertes Hydroxyprolin ist in einem 8 - 10 ml Volumen innerhalb einer Fraktion von 10 bis 27 ml Eluat enthalten (3.3.1.2.).

4.3. Wiederfindungsraten

Die Wiederfindungsrate zugesetzten Hydroxyprolins bei der Methode nach FIRSCHEIN und SHILL variiert in einem Bereich von 82,9 % bis 97,5 %; 80,2 % bis 97,4 % und 85,2 % bis 97,0 % (Tab. 5, 3.2.2., FIRSCHEIN u. SHILL).

Beim Vergleich dieser Werte mit denen der übrigen Verfahren ergibt sich eindeutig, daß die Streuung der Wiederfindungsraten bei der Chromatographiemethode nach FIRSCHEIN und SHILL am größten sind. Abbildung 4 (3.3.1.2.) zeigt außerdem, daß ein konstanter Austritt von Hydroxyprolin bei verschiedenen Säulen nicht erreicht werden kann. Zwar ist das freie Hydroxyprolin in einem relativ konstanten Volumen von 6 bis 10 ml Puffer enthalten, jedoch kann der Beginn des Hydroxyprolinaustritts in einem Bereich von 10 bis 18 ml Eluat liegen. Damit ist es unmöglich, isoliertes Hydroxyprolin von vor- oder nachlaufenden störenden Komponenten vollständig zu trennen.

Aufgrund der großen Streuung der Wiederfindungsraten und der Unsicherheit des Hydroxyprolinaustritts scheint die Chromatographiemethode nach FIRSCHEIN und SHILL zur genauen Bestimmung von Hydroxyprolin im Urin ungeeignet zu sein. Wir haben daher auf weitergehende Untersuchungen dieser Methode verzichtet.

Der geringste Verlust an zugesetztem H^3 -Hydroxyprolin ist mit dem Ionenaustauscherharz in Tablettenform nach GOVERDE und VEENKAMP (Mittelwert der Wiederfindungsraten 95,2 %) und der Extraktion mittels Toluol nach KIVIRIKKO et al. (Mittelwert 97,13 %) zu erreichen. Die Verfahren nach STALDER und GOVERDE u. VEENKAMP weisen mit $S = 1,36$ und $s = 1,18$ die kleinsten Standardabweichungen bei Verwendung von H^3 -Hydroxyprolin und einer Hydroxyprolinstandardlösung (20 μ l/ml) auf.

4.4. Absorptionsspektren

Wie aus Abb. 7 (3.3.3.) ersichtlich ist, läßt sich mit der Reinigungsmethode nach Le ROY et al. (1964) die höchste Extinktion (0,308) bei 560 nm erreichen. Im Vergleich zu einer Hydroxyprolinstandardlösung ähnlich hoher Extinktion im Maximum (Abb. 6), ist im Bereich oberhalb von 620 nm eine deutliche Erhöhung der Extinktionswerte zu erkennen. Auf der anderen Seite des Extinktionsmaximums geht die Extinktion bei 500 nm auf nur 0,232 zurück, bevor die Kurve im Bereich der UV-Absorption wieder ansteigt. Dieses läßt den Schluß zu, daß in der Probe enthaltene unspezifische UV-Strahlen absorbierende Substanzen die typische Absorptionskurve des Pyrrol-p-DAB-Farbkomplexes überlagern und so zu den hohen Extinktionswerten im gesamten Meßbereich führen. Eine Hydroxyprolinbestim-

mung im gleichen Urin ohne vorherige Reinigung zeigt diese Überlagerung besonders ausgeprägt (Abb. 7).

Das Absorptionsspektrum nach STALDER (1965) erbringt bei 560 nm einen um 0,034 kleineren Extinktionswert. Im über 600 nm liegenden Frequenzbereich entspricht die Kurve mit Werten unter 0,01 weitgehend einer Standardkurve gleicher Hydroxyprolinkonzentration. Auch der Rückgang der Extinktionswerte bei 500 nm bis auf 0,10 beweist eine bessere Abtrennung störender Begleitstoffe als es mit der Methode nach Le ROY et al. (1964) erreichbar ist.

Kurve III zeigt das Absorptionsspektrum, das mit dem Reinigungsverfahren nach GOVERDE und VEENKAMP (1972) gemessen werden kann. Aufgrund verschiedener Verdünnungsverhältnisse (s. 3.2.4.) kann bei gleichem Urin kein direkter Vergleich der Maximalextinktionen mit den beiden vorausgehenden erfolgen. Das gemessene Spektrum entspricht bei geringerer Maximalextinktion weitgehend der Absorptionskurve nach STALDER (1965) und zeigt damit an, daß neben dem Pyrrol-p-DAB-Farbkomplex im Wellenlängenbereich von 500 bis 700 nm keine störenden Komponenten vorliegen.

Die Extinktionswerte des Absorptionsspektrums nach der Methode nach KIVIRIKKO et al. (1967) oberhalb 600 nm liegen bei 0,025. Dieser ungünstige Verlauf der Kurve läßt auch hier auf Verunreinigungen schließen, die durch Toluolextraktionen nicht beseitigt werden können. Der übrige Verlauf der Kurve entspricht weitgehend dem Absorptionsspektrum des reinen Pyrrol-p-DAB-Farbkomplexes.

Die weiteren Untersuchungen wurden aufgrund der ungenügenden Abtrennung störender Begleitstoffe bei dem Verfahren nach Le ROY et al. (1964) auf die Methoden nach STALDER (1965), GOVERDE und VEENKAMP (1972) und KIVIRIKKO et al. (1967) beschränkt.

4.5. Extinktionsvergleich

Wie aus Tab. 7 (3.3.4.) hervorgeht, weist die Toluolextraktionsmethode nach KIVIRIKKO (1967) mit integriertem Bestimmungsgang einen Extinktionsmittelwert $\bar{x}$ von 0,132 (korrigierte Extinktion: 0,248) deutlich die geringste Empfindlichkeit auf. Die Tabelle zeigt weiterhin, daß mit der Reinigungsmethode nach GOVERDE und VEENKAMP (1972) und der vom Autor selbst angegebenen Bestimmungsmethode mit einer Extinktion von $\bar{x} = 0,148$ (korrigierte Extinktion: 0,433) eine höhere Empfindlichkeit erreicht werden kann als mit der Ionenaustauschermethode nach STALDER (1965) und der angeschlossenen modifizierten Hydroxyprolinbestimmungsmethode nach STEGEMANN (1958) ($\bar{x} = 0,312$, korrigierte Extinktion: 0,389).

Die Kombination der Reinigungsmethode nach GOVERDE und VEENKAMP (1972) mit der modifizierten Hydroxyprolinbestimmung nach STEGEMANN (1958) (3.2.4.) bringt eine Verminderung der Empfindlichkeit mit sich (Tab.7), so daß bei den weiteren Untersuchungen mit der empfindlicheren Methode nach GOVERDE und VEENKAMP (1972) gearbeitet wurde.

4.6. Wiederfindungsraten bei Verwendung von Urin

Die Verwendung von Urin (3.3.5.) anstelle von Hydroxyprolinstandardlösungen wirkte sich nur bei der Methode nach STALDER entscheidend aus: Durch die zusätzlichen Reinigungsschritte (Abdampfen der Salzsäure, Behandlung mit Aktivkohle) sank die mittlere Wiederfindungsrate von 94,23 auf 84,97 %. Dagegen stimmen die Wiederfindungsraten mit Standardlösungen und Urin bei der Methode nach GOVERDE und VEENKAMP mit 95,2 % und 94,17 % gut überein.

4.7. pH-Abhängigkeit des Analysenganges

Abb. 8 (3.3.6.) zeigt, daß die Farbentwicklung in einem Bereich von pH 4 bis 9 vom pH-Wert in der gereinigten Probe unabhängig ist. Oberhalb und unterhalb dieses Bereiches ist ein deutlicher Abfall der gemessenen Extinktionswerte zu erkennen.

5. D i s k u s s i o n

Im Rahmen der Hydroxyprolinbestimmung im Urin wurden in der vorliegenden Arbeit die Abtrennungsmethoden (3.2.) zur Reinigung des Urins von störenden Komponenten untersucht. Dabei läßt sich die Hydroxyprolinbestimmung in folgende Schritte einteilen:

1. Hydrolytische Aufspaltung hydroxyprolinhaltiger Peptide.
2. Abtrennung störender Begleitkomponenten (1.2.Tab.3)
3. Photometrische Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentration nach Farbkomplexbildung in der gereinigten Probe.

Die im experimentellen Teil durchgeführten Untersuchungen zur Abtrennung störender Begleitstoffe lassen sich in mehrere Abschnitte unterteilen, in denen die gefundenen Ergebnisse diskutiert werden sollen.

5.1. Hydrolyse

Die Hydrolyse der hydroxyprolinhaltigen Peptide wurde in 6 n HCl durchgeführt. Dabei ergab sich, daß sich eine vollständige Aufspaltung der Peptide bei allen drei von uns angewandten Temperaturen (100° , 115° , 135° C) erreichen ließ, und bei ausreichender Einwirkungszeit die Temperatur ohne Bedeutung ist. Diese Ergebnisse bestätigen entsprechende Untersuchungen von MEE (1973). MEE fand selbst bei Erhöhung der Hydrolysetemperatur auf 145° C (Einwirkungsdauer 2, bzw. 4 Stunden) im Vergleich zur Hydrolyse bei 100° C (Einwirkungsdauer 16 Stunden)

keine Veränderungen in der gemessenen Hydroxyprolinkonzentration. Damit ergibt sich für die klinisch-chemische Routinediagnostik die Möglichkeit sowohl über Nacht, als auch in 3 Stunden die zu untersuchenden Proben zu hydrolysieren.

5.2. Elution des Hydroxyprolins

In Abschnitt 3.3.1. wurden die chromatographische Methode nach FIRSCHEIN und SHILL (1966) und die Ionenaustauschermethode von STALDER (1965) hinsichtlich der Elution des durch Hydrolyse freigesetzten Hydroxyprolins untersucht. Dabei zeigte sich, daß bei der Methode nach FIRSCHEIN und SHILL das Hydroxyprolin nicht immer in der gleichen Eluatfraktion vorlag. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise darin, daß eine für die Chromatographie wichtige, homogene Packung der Partikel sowie eine konstante Fließgeschwindigkeit des Elutionsmittels nur schwierig zu erreichen ist (s. Tab. 4 und Abb. 5 in 3.3.1.2.). Bei der Untersuchung der von STALDER angegebenen Ionenaustauschermethode wurde ein reproduzierbares Auftreten von Hydroxyprolin in den letzten 20 ml des Eluates gefunden. Die ersten 10 ml des Eluates können nach den Ergebnissen verworfen werden. STALDER führte die gesamte Menge des Eluates der Bestimmung zu. Damit ist nach unserer Methode sowohl eine Zeitersparnis beim anschließenden Verdampfen einer geringeren Flüssigkeitsmenge als auch eine erhöhte Eliminierung von Störfaktoren zu erzielen.

5.3. Wiederfindungsrate, Absorptionsspektrum, Empfindlichkeit

Beim Vergleich der Wiederfindungsraten ergab sich, daß bei der Chromatographiemethode nach FIRSCHEIN und SHILL (1966)

ie niedrigste Wiederfindungsrate (89,7 %) gemessen wurde. agegen geben FIRSCHEIN und SHILL bei den von ihnen durchgeführten Versuchen mit innerem Standard eine mittlere iederfindungsrate von 98,3 % an.

ie Überprüfung der Abtrennungsmethoden nach GOVERDE und VEENAMP (1972) und KIVIRIKKO (1967) ergab die höchste Wiederfindungsrate (95,2 % bzw. 96,48 %). Vermutlich ist dies auf ie geringere Zahl der Reinigungsschritte (keine Chromatographie- bzw. Ionenaustauschersäulen) zurückzuführen.

as Absorptionsspektrum des bei der Reaktion von Pyrrolid und p-Dimethylaminobenzaldehyd gebildeten Farbkomplexes in Hydroxyprolinstandardlösungen ermöglichte uns den Einfluß störender Komponenten im Urin auf das Spektrum zu erkennen (3.3.3. Abb. 7). Aufgrund der Versuche mit Standardlösungen und gereinigten Urinproben ergibt sich eine auffallende Übereinstimmung der Absorptionsspektren mit einem Maximum bei 560 nm und einer Schulter bei 225 nm (3.3.3. Abb. 6 u. 7). MITCHEL und TAYLOR (1970) haben ebenfalls die Absorptionsspektren verschiedener Methoden verglichen. Auch von ihnen wird dieses typische Verhalten des Absorptionsspektrums beschrieben.

Im Vergleich der Spektren aus Standardlösungen und aus gereinigten Proben ergibt sich mit den Reinigungsmethoden nach STALDER (1965), GOVERDE und VEENKAMP (1972) und KIVIRIKKO et al. (1967) die größte Übereinstimmung.

Im Verlauf der Empfindlichkeitsmessungen zeigte sich, daß die Methode nach KIVIRIKKO et al. (1967) eindeutig die geringste Empfindlichkeit aufweist. Der bei der Chromatographie nach FIRSCHEIN und SHILL (1966) gemessene vergleichsweise hohe Hydroxyprolinverlust (4.3.) und die Inkonsistenz der Hydroxyprolinelution (4.2.2.), die geringe Empfindlich-

keit bei der Methode von KIVIRIKKO et al. (1967) (4.5.) und die Abweichung vom Standardabsorptionsspektrum bei der Methode nach Le ROY (1964) (4.4.) haben dazu geführt, daß diese Methoden bei unseren Untersuchungen nicht weiter verwendet wurden. Die Untersuchungen über die Wiederfindungsraten bei Verwendung von Urin bestätigen die schon weiter oben angegebene Vermutung, daß mit der Reinigung an einer Chromatographiesäule durch den komplizierteren Versuchsablauf ein erhöhter Verlust an Hydroxyprolin in Kauf genommen werden muß. So fällt die mittlere Wiederfindungsrate bei der Methode von STALDER (1965) von 94,3 % (Standardlösung) durch die bei Urin notwendige Behandlung mit Aktivkohle (Verlust: 6,7 %) und Abdampfen des Eluates auf 85,0 % (3.3.5. Tab. 8), während bei der Methode von GOVERDE und VEENKAMP (1972) die Wiederfindungsraten gut übereinstimmen (95,2 % bei Standardlösungen, 95,1 % bei Urin).

Diese Ergebnisse lassen es unnötig erscheinen, zur Abtrennung störender Komponenten bei der Hydroxyprolinbestimmung im Urin Chromatographiesäulen zu verwenden. Mit der Methode nach GOVERDE und VEENKAMP (1972) können bei einem geringeren Zeitaufwand bessere Ergebnisse in Bezug auf Wiederfindungsrate, Empfindlichkeit und Übereinstimmung mit dem Standardspektrum erzielt werden.

5.4. pH-Abhängigkeit des Analysenganges

Nach RAAB (1971), STEGEMANN und STALDER (1967) und STEGEMANN (1958) wird eine strenge Einhaltung eines schwach sauren Milieus (pH 6) in der gereinigten Probe gefordert. Nach den vorliegenden Ergebnissen (3.3.6.) liegt bei der von uns

empfohlenen Methode der optimale pH-Bereich zwischen pH 4 und pH 9. Eine Störung des Bestimmungsganges durch verschiedene pH-Werte des zu untersuchenden Urins ist damit weitgehendst ausgeschlossen.

6. Zusammenfassung

Die Aminosäure Hydroxyprolin kommt in hoher Konzentration nur im Kollagen vor. Veränderungen im Kollagenstoffwechsel können zu einer Erhöhung oder Verminderung der Hydroxyprolinausscheidung im Urin führen. Die quantitative Hydroxyprolinbestimmung im Urin kann deshalb ein Hilfsmittel zur Diagnose von Krankheiten sein, die mit einer Veränderung des Kollagenstoffwechsels einhergehen.

Bei den bisher beschriebenen Bestimmungsmethoden wird immer wieder auf die Störung der im Urin enthaltenen Chromogene hingewiesen. In der vorliegenden Arbeit sollten daher verschiedene Methoden zur Abtrennung solcher störenden Chromogene untersucht werden. Hierzu wurden fünf von verschiedenen Autoren (STALDER, KIVIRIKKO, GOVERDE u. VEENKAMP, FIRSCHEIN u. SHILL und Le ROY et al.) angegebene Methoden zur Abtrennung störender Komponenten überprüft und je nach Notwendigkeit modifiziert.

Ermittelt wurden die zur vollständigen Hydrolyse der Harnpeptide erforderliche Temperatur und Einwirkungszeit. Durch Verwendung von markiertem Hydroxyprolin wurden die Wiederfindungsraten ermittelt. Der Einfluß störender Chromogene wurde durch Vergleich mit dem Absorptionsspektrum aus Hydroxyprolinstandardlösungen gemessen. Zur Bestimmung der Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit wurden 15 Hydroxyprolinbestimmungen mit drei verschiedenen Methoden durchgeführt und Variationskoeffizient und Standardabweichung ermittelt. Die Abhängigkeit der Farbkomplexbildung vom pH-Wert in der gereinigten Probe wurde unter Verwendung der Methode nach GOVERDE u. VEENKAMP (1972) bestimmt.

Die Untersuchungen ergaben, daß sich eine vollständige Aufspaltung der Peptide durch Hydrolyse mit allen gebräuchlichen Temperaturen (100° , 115° , 135°) bei Einhaltung der Mindestzeiten (16 h, 5 h, 3 h) erreichen läßt.

Die Abtrennungs- und Bestimmungsmethode nach GOVERDE und VEENKAMP erwies sich nach den durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes im Urin am geeignetsten. Es zeigte sich eine gute Übereinstimmung mit dem Absorptionsspektrum aus Hydroxyprolinstandardlösungen.

Die Wiederfindungsrate an zugesetztem markiertem Hydroxyprolin betrug 95,2 %. Die Bestimmungsmethode erwies sich als empfindlichste und in einem Bereich von pH 4 bis pH 9 vom pH-Wert der gereinigten Probe unabhängig. Die Anwendung dieser Methode macht die Verwendung von Ionenaustauschersäulen und Chromatographiesäulen überflüssig.

7. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- ADAMS, E. and A. GOLDSTONE: Hydroxyproline metabolism,
II. J. Biol. Chem. 235, 3492 - 3498 (1960 a).
- ADAMS, E. and A. GOLDSTONE: Hydroxyproline metabolism,
IV. J. Biol. Chem. 235, 3504 - 3512 (1960 b).
- ALEXEENKO, L.P. and V.N. OREKHOVICH: A method for proline
and hydroxyproline determination by means of nin-
hydrin reaction in acid medium after starch chro-
matography.
Dokl. Akad. Nauk SSSR 133, 690 - 693 (1960)
- ARNOLD, E., E. HVIDBERG and S. RASMUSSEN: Methodological
studies of the distribution of hydroxyproline in
human serum.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 24, 231 - 235 (1969)
- BANNISTER, B. W. and A.B. BURNS: Adaption of the Bergman and
Loxley technique for hydroxyproline determination
to the autoanalyser and its use in determining plas-
ma hydroxyproline in the domestic fowl.
Analyst 95, 596 - 600 (1970).
- BENOIT, F.L. and R.H. WATTEN: Evidence for renal tubular
secretion of hydroxyproline peptides.
Clin. Res. 12, 247 - 255 (1964).
- BENOIT, F.L. and R.H. WATTEN: Renal tubular transport of
hydroxyproline peptides: evidence for reabsorption
and secretion.
Metabolism 17, 20 - 23 (1968).

- BLAU, K. and A. DABRE: Gaschromatography of volatile amino acids derivatives.
J. Chromatog. 17, 445 - 449 (1965).
- BLUMENKRANTZ, N. and G. ASBOE-HANSON: A quick and specific assay for hydroxyproline.
Anal. Biochem. 55, 288 - 291 (1973)
- BOREL, J.P., J.M. CARANJOT and M.F. JAYLE: Un mode de fractionnement des peptides urinaires contenant de 1^1 hydroxyproline.
Clin.Chim. Acta 16, 409 - 416 (1967)
- BUDDECKE, E. : Grundriß der Biochemie
Berlin (1971)
- BURKHARDT, H., F. BURKHARDT and K. ROMMEL: Die Messungen des Kollagenstoffwechsels mit dem Hypronosticon-Test.
Dtsch. Med. Wochenschr. 98, 1847 - 1848 (1973)
- CALLAHAN, P.X., J.A. SHEPARD and S. ELLIS: Accelerated chromatographic method for determination of hydroxyproline.
Anal. Biochem. 49, 155 - 163 (1972).
- CHVAPIL, M. and B. CMUCHALOVA: Dynamics of changes in connective tissue components during development of carrageenan granuloma.
- CHVAPIL, M. and D.S. JACKSON: Evidence of the degradative origin of free hydroxyproline and peptides containing hydroxyproline.
Collagen Currents 5, 161 (1964)
- CLEARY, J. and R.A. SAUNDERS: A simplified procedure for the measurement of total hydroxyproline in urine.
Clin. Chim. Acta 57, 217 - 223 (1974)

- CUCCO, A. : Determination of hydroxyproline in collagen and leather.
Cuoio, Pelll, Mat. Concianti 38, 214 (1962).
- CURTISS, P.H. : Diskussionsbeitrag zu: The Russel A.Hibbs Society.
J. Bone Surg., Am. Ed. 45, 439 (1963).
- DREUX, C. and J. LEYMARIE: Dosage automatique de l'hydroxyproline urinaire.
Ann. Biol. Clin. 26, 641 - 650 (1968).
- DULL, T.A. and H. HENNEMAN: Urinary hydroxyproline as an index of collagen turnover in bone.
N. Engl. J. Med. 268, 132 - 134 (1963).
- DUPONT, A. : On the determination of hydroxyproline in urine.
Clin. Chim. Acta 18, 59 - 63 (1967).
- FILLIAT, M. , J. COTTE and M. BRUNET: Method of determination of urinary hydroxyproline.
Path. Biol. 14, 767 - 770 (1966).
- FIRSCHEIN, H.E. and J.P. SHILL: The determination of total hydroxyproline in urine and bone extracts.
Anal. Biochem. 14, 296 - 304 (1966) .
- FREY, J. : Etude d'une méthode d'exploration et du taux normal de l'hydroxyproline du sérum.
Biochim. Biophys. Acta 111, 440 - 449 (1965).
- GIBBS, B.F., K. HIABA and J.C. CRAWHALL: Gas chromatographic estimation of hydroxyproline.
Clin. Chim. Acta 54, 395 - 398 (1974)
- GOLL, D.E., R.W. BRAY and W.G. HOEKSTRA: Age-associated change in muscle composition. The isolation and properties of a collagenous residue from bovine muscle.
J. Food.Sci. 28, 503 - 509 (1963).

- GOVERDE, B.C. and F.J.N. VEENKAMP: Routine assay of total urinary hydroxyproline based on resin-catalysed hydrolysis.
Clin. Chim. Acta 41, 29 - 40 (1972).
- GRANT, R.A. : Estimation of hydroxyproline by the autoanalyser.
J. Clin. Path. 17, 685 - 686 (1964).
- GRASSMANN, W., J. ENGEL, K. HANNIG, H. HÖRMANN, K. KÜHN u. A. NORDWIG: Kollagen.
Fortschr. Chem. org. Naturst. 23, 195 - 314 (1965)
- GRAY, D.O., J. BLAKE, D.H. BROWN and L. FOWDEN: chromatographic separation of amino acid isomers.
J. Chromatolog. 13, 276 - 277 (1964).
- GREEN, N.M. and D.A. LOWTHER: Formation of collagen hydroxyproline in vitro.
Biochem. J. (London) 71, 55 - 66 (1959).
- GROSS, J. : Studies in the formation of collagen. IV Effect of vitamin C deficiency on the neutral salt extractable collagen of skin.
J. Exper. Med. 109, 557 - 569 (1959).
- HANNIG, K. and A. NORDWIG: Amino acid sequences in collagen.
In G.N. Ramachandran (ed.) : Tritise on collagen, Vol. 1, p. 73.
London-New York, 1967.
- HANSON, H. and B.WIEDERANDERS: Fractionation of hydroxyproline-containing urinary peptides by Sephadex gel filtration.
Clin. Chim. Acta 25, 655 - 662 (1969).

- HEIDRICH, G.L. and L. WYNSTON: A report on the presence of a third alpha component in calf and rat skin tropocollagen.
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 342, 166 - 169 (1965).
- HOLZMANN, H., B. MORSCHES, R. GEBHARDT u.F. LIEDTKE:
Zum "collagen-like protein"-Gehalt im Serum von Psoriatikern.
Klin. Wschr. 48, 1197 - 1198 (1970).
- HOWELLS, G.R. and R.G. WHITEHEAD: A system for the estimation of the urinary hydroxyproline index.
J. med. Lab. Tech. 24, 98 - 102 (1967).
- HURYCH, J. and M. CHVAPIL: Influence of chelating agents on the biosynthesis of collagen.
Biochim. Biophys. Acta 97, 361 - 363 (1965).
- HUTTERER, E. and E.J. SINGER: A modified method for hydroxyproline determination.
Analyt. Chem. 32, 556 - 558 (1960).
- JACKSON, D.S., J.P. BENTLEY: On the significance of the extractable collagens.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 37 - 42 (1960).
- JACKSON, D.S. and E. G. CLEARY: the determination of collagen and elastin.
Meth. Biochem. Anal. 15, 25 - 76 (1967).
- JASIN, H. E., C.W. FINK, W. WISE and M. ZIFF: Relationship between urinary hydroxyproline and growth.
J. Clin. Invest. 41, 1928 - 1935 (1962).
- JONES, J.D., A.C. SKALET and P.C. BURNETT: Automated determination of total hydroxyproline in urine: use of internal standard.
Anal. Biochem. 37, 194 - 197 (1970).

- JUVA, K., D.J. PROCKOP, G.W. COOPER and J.W. LASH: Hydroxylation of proline and the intracellular accumulation of a polypeptide precursor of collagen.
Science 152, 92 (1966).
- KEISER, H. R., E.C. Le ROY, S. UDENFRIEND and A. SJOERDSMA: Collagen-like protein in human plasma.
Science 142, 1678 - (1963).
- KIBRICK, A.C., C.Q. HASHIRO and L.B. SAFIER: Hydroxyproline peptides of urine in arthritic patients and controls on a collagen-free diet.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. (N.Y.) 109, 473 - 478 (1962).
- KIBRICK, A.C., G. KITAGAWA, M.L. MASKALERIS and A.T. MILHORAT: Hydroxyproline in human blood; forms in which is present.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. (N.Y.) 119, 622 - 625, (1965).
- KIBRICK, A.C., H. BIENENSTOCK and K. D. SINGH: Serum protein and non-protein hydroxyproline in patients with rheumatoid arthritis: Description of modified method for protein hydroxyproline.
Clin. Chim. Acta 46, 173 - 180 (1973).
- KIVIRIKKO, K.I.: Hydroxyproline-containing fractions in normal and cortison-treated chick embryos.
Acta physiol. Scand. 60, Suppl. 219, (1963).
- KIVIRIKKO, K.I., O. LAITINEN and D.J. PROCKOP: Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine.
Anal. Biochem. 19, 249 - 255 (1967).
- KIVIRIKKO, K.I. and D.J. PROCKOP: Enzymatic hydroxylation of proline and lysine in protocollagen.
Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 782 - 789 (1967 a).

- KIVIRIKKO, K.I. and D.J. PROCKOP: Purification and partial characterization of the enzyme for the hydroxylation of proline in protocollagen.
Arch. Biochem. Biophys. 118, 611 - 618 (1967 b).
- KIVIRIKKO, K.I. and D.J. PROCKOP: Hydroxylation of proline in sythetic polypeptides with purified protocollagen-hydroxylase.
J. Biol. Chem. 242, 4007 - 4012 (1967 c).
- KLEIN, L., F.W. LAFFERTY, O.H. PEARSON and P.H. CURTISS: Correlation of urinary hydroxyproline serum alkaline phosphatase and skeletal calcium turnover.
Metab. Clin. Exp. 13, 272 - 284 (1964).
- KOBRLE, V. and M. CHVAPIL: Isolation of peptides containing hydroxyproline from animal tissues.
Nature (London), 190, 909 - 910 (1961a).
- KOBRLE, V. and M. CHVAPIL: Changes of ultrafiltrable hydroxyproline in blood serum during development of carcinoma granulo-ma and during aging of rats and guinea pigs.
Experientia (Basel) 17, 519 - 520 (1961 b).
- KOEVOET, A.L. and J.D. BAARS: The determination of urinary hydroxyproline.
Clin. Chim. Acta 25, 39 - 43 (1969).
- KORTING, G.W. u. H. HOLZMANN: Die Sklerodermie und ihr nahe-stehende Bindegewebsprobleme.
Stuttgart, 1967.
- LAITINEN, O., E.A. NIKKILA and K.I. KIVIRIKKO: Hydroxyproline in the serum and urin. Normal values and clinical significance.
Acta Med. Scand. 179, 275 - 284 (1966).

- LAITINEN, O. : The metabolism of collagen and its hormonal control in the rat.
Acta endocr. Suppl. 120, 86 (1967).
- LAMPORT, D.T. : The isolation and partial characterization of hydroxyproline-rich glycopeptides obtained by enzymatic degradation of primary cell walls.
Biochemistry (Wash.) 8, 1155 - 1163 (1969).
- LANG, K. Eine Mikromethode zur Bestimmung des Prolins und des Oxyprolins.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. chem. 219, 148 - 154 (1933).
- LEACH, A.A.: The determination of gelatin in blood and urine
Anal. Biochem. 2, 529 - 531 (1961).
- Le ROY, E. C. , A. KAPLAN, S. UDENFRIEND and A. SJOERDSMA:
A hydroxyproline-containing, collagen-like protein in plasma and a procedure for its assay.
J. Biol. Chem. 239, 3350 - 3356 (1964).
- Le ROY, E.C. and A. SJOERDSMA: Clinical significance of a hydroxyproline-containing protein in human plasma.
J.Clin. Invest. 44, 914 - 919 (1965).
- Le ROY, E.C., E.D. HARRIS and A. SJOERDSMA: A modified procedure for radioactive hydroxyproline in urine and tissues after labeled proline administration.
Anal. Biochem. 17, 377 - 382 (1966).
- Le ROY, E.C.: The technique and significance of hydroxyproline measurement in man.
Advances Clin. Chem. 10, 213 - 153 (1967).
- LUKENS, L.N.: Evidence for the nature of the precursor that is hydroxylated during the biosynthesis of collagen hydroxyproline.
J. Biol. Chem. 240, 1661 - 1669 (1965).

- MARCUCCI, F. and E. MUSSINI: Separation of proline and hydroxyproline derivatives by thin-layer chromatography.
J. Chromatog. 18, 431 - 432 (1965).
- MEE, J.M.L.: Specific assay of hydroxyproline by gas chromatography.
J. Chromatog. 87, 155 - 161 (1973).
- MEILMAN, E., M.M. URIVETZKY and C.M. RAPOPORT: Urinary hydroxyproline peptides.
J. Clin. Invest. 42, 40 - 50 (1963).
- MITCHELL, A.D. and J.E.P. TAYLOR: The spectrophotometric determination of hydroxyproline. An analytical investigation.
Analyst 95, 1003 - 1011 (1970).
- MITOMA, C., T.E. SMITH, J.D. DAVIDSON, S. UDENFRIEND, F.M. COSTA and A. SJOERDSMA: Improvements in methods for measuring hydroxyproline: application to human urine.
J. Laborat. Clin. Med. 53, 970 - 976 (1959).
- MORSCHES, B., H. HOLZMANN und A. SCHLAUDECKER: Untersuchung zum Verhalten des "Collagen-like-Protein" im Serum von Ratten in Abhängigkeit vom Alter und von der Anwendung verschiedener bindegewebswirksamer Substanzen.
Ärztliche Forschung 21, 421 - 430 (1967).
- MORSCHES, B.: Tierexperimentelle Untersuchungen über die Beziehungen zwischen der Hydroxyprolinausscheidung im Urin und den Hydroxyprolin-Fraktionen im Serum.
Habil.-Schrift, Mainz 1973.
- MÜHLBACH von R., D. HIRTHE and K. LINDENHAYN: The elimination of bound hydroxyproline as an expression of alterations of the organic matrix of cartilage and bone.
Z. Arzneimittel Fortbild. 60, 597 - 602 (1966).

- MUSSINI, E. and F. MARCUCCI: Separation of prolines and hydroxyprolines by gaschromatography.
J. Chromatog. 20, 266 - 269 (1965).
- MYHILL, D. and D.S. JACKSON: Separation of proline and hydroxyproline using thin-layer chromatography.
Anal. Biochem. 6, 193 - 198 (1963).
- NAGAI, Y., C.M. LAPIERE and J. GROSS: Tadpole collagenase. Preparation and purification.
Biochemistry 5, 3123 - 3130 (1966).
- NICHOLLS, C.H., S. MAKISUMI and H.A. SAROFF: Gaschromatography of the methyl esters of the amino acids as the free base and by dissociation of their acid salts.
J. Chromatog. 11, 327 - 330 (1963).
- NEUMAN, R.E. and M.A. LOGAN: The determination of hydroxyproline.
J. Biol. Chem. 184, 299 - 306 (1950).
- ORLOFT, S., V.H. RAO and L. VERBRUGGEN: Automated analyser of total urinary hydroxyproline based on resin-catalysed hydrolyses.
Z.Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 549 - 552 (1975).
- PAREKH, A.C. and D.H. JUNG: An improved method for determination of total hydroxyproline in urine.
Biochem. Med. 4, 446 - 456 (1970).
- PARTRIGE, S.M. and D.F. ELSDEN: Rapid methods for the determination of glucosamine, galactosamine and hydroxyproline.
Biochem. J. 80, 34 P (1961).
- PENNOCK, C.A., G.R. MOORE and M.D. HOYLE: Estimation of hydroxyproline in urine.
J. Med. Lab. Technol. 27, 302 - 307 (1970).

- PIEZ, K.A., F. IRREVERRE and H.L. WOLFF: The separation and determination of cyclic imino acids.
J. Biol. Chem. 223, 687 - 697 (1956).
- PIEZ, K.A.: Nonidentity of the three α -chains in codfish collagen.
J. Biol. Chem. 239, 4215 (1964).
- PILIC, J.J. and A.A. TITAEV: Procedure for the determination of hydroxyproline and proline in biological fluids.
Lab. Delo. 9, 22 - 25 (1963).
- PROCKOP, D.J. and S. UDENFRIEND: A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissue and urine.
Anal. Biochem. 1, 228 - 239 (1960).
- PROCKOP, D.J. and A. SJOERDSMA: Significance of urinary hydroxyproline in man.
J. Clin. Invest. 40, 843 - 849 (1961).
- PROCKOP, D.J., H.R. KEISER and A. SJOERDSMA: Gastrointestinal absorption and renal excretion of hydroxyproline peptides.
Lancet 2, 527 - 528 (1962).
- PROCKOP, D.J.: Isotopic studies on collagen degradation and the urine excretion of hydroxyproline.
J. Clin. Invest. 43, 453 - 460 (1964).
- PROCKOP, D.J. and K. JUVA: Synthesis of hydroxyproline in vitro by the hydroxylation of proline in a precursor of collagen.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 53, 661 - 668 (1965).
- RAAB, W.: Bestimmungsmethode für Hydroxyprolin im Harn.
Dtsch. Med. J. 22, 264 - 265 (1971).
- REICH, G.: Kollagen.
Dresden 1966.

- ROGERS, C.J., J.R. KIMMEL, M.E. HUTCHIN and H.A. HARPER:
A hydroxyproline method of analysis for a modified
gelatin in plasma and urine.
J. Biol. Chem. 206, 553 - 559 (1954).
- ROSANO, C.L. : Enzymatic method for determination of hydroxy-
proline.
Anal. Biochem. 15, 341 - 345 (1966).
- SATWEKAR, K. A.N. RADHAKRISHNAN: Urinary hydroxyproline
excretions in patients with tropical sprue.
Clin. Chim. Acta 19, 284 - 285 (1964).
- SERAFINI-CESSI, F. and C. CESSI: An improved method for the
determination of hydroxyproline in protein hydroly-
sates.
Anal. Biochem. 8, 527 - 528 (1964).
- SEYMOUR, G.C. and M.J. JACKSON: Specific automated method
for measurement of urinary hydroxyproline.
Clin. Chem. 20, 544 - 546 (1974).
- SCHULTZ-HAUDT, S.D., J. AARLI, A. LOHRMANN NIELSEN and O. UNHJEM:
Hydroxyproline containing glycopeptides of some human
and animal tissues.
Biochim. Biophys. Acta 101, 292 - 299 (1965).
- SCRIVER, C.R. and H. GOLDMANN: Renal tubular transport of
proline, hydroxyproline and glycine. II. Hydroxy-
proline as substrate and as inhibitor in vivo.
J. Clin. Invest. 45, 1357 - 1363 (1966).
- SJOERDSMA, A.S. UDENFRIEND, H. KEISER and E.C. Le ROY:
Hydroxyproline and collagen metabolism.
Ann. Int. Med. 63, 672 - 694 (1965).
- STALDER, K.: Bestimmung von Hydroxyprolin im Harn.
Z. Anal. Chem. 212, 196 - 199 (1965).

- STANLEY, E.M., K.B. DAWSON, E.O. FIELD and A.S. GLICKSMAN:
An isotope dilution method for determination the
absolute amounts and specific activities of proli
and hydroxyproline in tissues.
Int. J. Appl. Radiation Isotopes 17, 467 - 477 (1
- STEGEMANN, H.: Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chlor-
amin-T und p-Dimethylaminobenzaldehyd.
Z. Physiol. Chem. 311, 41 - 45 (1958).
- SWITZER, B.R. and G.K. SUMMER: Improved method for hydroxyp
line analysis in tissue hydrolysates.
Anal. Biochem. 39, 487 - 491 (1971).
- TITAEV, A.A.: Determination of collagen-like proteins in bl
serum.
Lab. Delo. 9, 5 - 7 (1963).
- TOMASZEWSKI, J.: Purification of hydroxyproline-containing
protein from human serum.
Acta Biochim. Pol. 18, 277 - 282 (1971).
- WALDSCHMIDT-LEITZ, E. and S. AKABORI: Bestimmung von Oxipro
Zur Methode nach K. Lang.
Z. Physiol. Chem. 224, 187 - 192 (1934).
- WALSER, A. and G.A. SCHOENBERGER: Practical evaluation of
a new method for the routine determination of urin
hydroxyproline (UHP).
Arzneim. Forsch. 24, 841 - 843 (1974).
- WATERMANN, R.: Untersuchungen zur photometrischen Bestimmun
von Hydroxyprolin.
Dissertation, Mainz 1978.
- WISS, von O.: Über eine Mikrobestimmung des Oxyprolins in
Blut und Harn; Beeinflussung des Oxyprolingehaltes
durch Verabreichung von Prolin.
Helv. Chim. Acta 32, 149 - 153 (1949).

- WOESSNER, J.F.: The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino-acid.
Arch. Bioch. Biophys. 93, 440 - 447 (1961).
- WOESSNER, J.F., Jr.: Biological mechanism of collagen resorption. In: Gould, B.S. (ed.): Treatise on collagen. Vol.2, Part B, New York, 1968.
- ZIFF, M., A. KIBRICK, E. DRESNER and H-J. GRIBETH: Excretion of hydroxyproline in patients with rheumatic and nonrheumatic diseases.
J. Clin. Invest. 35, 579 - 587 (1956).

8. A N H A N G

Tabelle zu Abb. 3

h	100° C	MW	115° C	MW	135° C	MW
0,5					0,437/0,432/0,430	0,433
1			0,407/0,406/0,402	0,405	0,555/0,561/0,565	0,561
2	0,249/0,257/0,259	0,255	0,514/0,508/0,512	0,510	0,631/0,633/0,639	0,634
3	0,328/0,322/0,316	0,322	0,584/0,581/0,575	0,580	0,652/0,549/0,649	0,650
4	0,379/0,386/0,90	0,385	0,637/0,643/0,641	0,640	0,646/0,649/0,652	0,649
5	0,439/0,447/0,449	0,445	0,646/0,651/0,647	0,648	0,651/0,647/0,652	0,650
6	0,440/0,499/0,519	0,510	0,648/0,652/0,649	0,650	0,640/0,648/0,645	0,643
7	0,551/0,561/0,553	0,555	0,650/0,648/0,648	0,649	0,647/0,651/0,655	0,651
8	0,589/0,580/0,584	0,585				
9	0,603/0,615/0,612	0,610				
10	0,629/0,625/0,621	0,625				
11	0,639/0,630/0,631	0,634				
12	0,630/0,634/0,641	0,635				
13	0,640/0,641/0,640	0,640				
14	0,640/0,646/0,646	0,644				
15	0,650/0,647/0,650	0,649				
16	0,647/0,649/0,650	0,648				
17	0,652/0,649/0,649	0,650				
18	0,657/0,654/0,656	0,655				
19	0,648/0,649/0,653	0,650				
20	0,648/0,645/0,651	0,648				

Einzelwerte zu Tab.5

S T A L D E R

Probe	zugesezt	wiedergef.	zugesezt	wiedergef.	zugesezt	wiedergef.
1	55634	53353	62857	59588	56840	54225
2	55634	53742	62857	58205	56840	53089
3	55634	52185	62857	59777	56840	54112
4	55634	52963	62857	60908	56840	52747
5	55634	52351	62857	59085	56840	53600
6	55634	52797	62857	59022	56840	52293
7	55634	51517	62857	59588	56840	52406

L e R O Y e t. a l.

1	68342	66565	72840	72621	70460	64471
2	68342	60756	72840	69635	70460	68346
3	68342	66633	72840	67377	70460	67642
4	68342	61371	72840	71602	70460	66373
5	68342	63831	72840	68178	70460	64682
6	68342	65813	72840	70800	70460	64048
7	68342	62669	72840	68324	70460	67430

F I R S C H E I N u n d S H I L L

1	80605	68675	75287	60380	67148	63656
2	80605	73753	75287	73330	67148	58620
3	80605	70690	75287	68436	67148	61037
4	80605	78589	75287	71221	67148	63522
5	80605	66821	75287	67909	67148	59560
6	80605	67870	75287	69715	67148	57210
7	80605	75527	75287	63467	67148	65133

G O V E R D E u n d V E E N K A M P

			Probe	zugesezt	wiedergefunden
1	42408	40542	8	42408	39779
2	42408	40966	9	42408	40075
3	42408	39948	10	42408	39397
4	42408	40839	11	42408	40796
5	42408	40245	12	42408	40160
6	42408	41220	13	42408	40372
7	42408	40287	14	42408	40712

K I V I R I K K O e t. a l.

	67430	66014	8	67430	64530
	67430	65946	9	67430	64935
	67430	66148	10	67430	66081
4	67430	65339	11	67430	64867
5	67430	65946	12	67430	65407
6	67430	66216	13	67430	64665
7	67430	65879	14	67430	64935

Zu 3.3.4. Tab. 6

Probe Nr.	STALDER	KIVIRIKKO	GOVERDE u. VEENKAMP	GOVERDE u.VEENKAMP mit mod. Bestimmungsmethode nach STEGEMANN
1	0,302	0,130	0,152	0,210
2	0,304	0,133	0,140	0,195
3	0,319	0,125	0,147	0,196
4	0,311	0,129	0,154	0,212
5	0,314	0,140	0,159	0,211
6	0,301	0,128	0,140	0,206
7	0,314	0,132	0,154	0,206
8	0,325	0,140	0,141	0,219
9	0,310	0,125	0,143	0,214
10	0,308	0,120	0,159	0,200
11	0,319	0,138	0,138	0,179
12	0,312	0,141	0,150	0,189
13	0,312	0,136	0,149	0,205
14	0,309	0,131	0,146	0,207
15	0,314	0,126	0,152	0,200
MW	0,312	0,132	0,148	0,203
S ⁺	0,0065	0,0064	0,0068	0,010
VK	2,08 %	4,85 %	4,59 %	4,93 %

Einzelwerte zu Tab. 8

Säule/Probe	S T A L D E R			GOVERDE u. VEENKAMP	
	zugesetzte Aktivität	nach Aktivkohle	In gereinigter Probe	zugesetzt	wiedergefunden
I	66785 cpm	62494 cpm=93,5 %	57691 cpm= 86,3 %	128248 cpm	122235 = 95,3 %
II	77034 cpm	70510 cpm=91,4 %	67175 cpm= 87,2 %	107197 cpm	103247 = 96,3 %
III	71153 cpm	66215 cpm=93,4 %	61768 cpm= 86,8 %	139820 cpm	131725 = 94,2 %
IV	73264 cpm	69120 cpm=94,1 %	61775 cpm= 84,3 %	119027 cpm	110600 = 92,9 %
V	69793 cpm	65018 cpm=93,1 %	57450 cpm= 82,3 %	100793 cpm	95980 = 95,2 %
VI	70175 cpm	65199 cpm=92,9 %	61904 cpm= 88,2 %	124722 cpm	120905 = 96,9 %
VII	69649 cpm	63518 cpm=91,2 %	59132 cpm= 84,9 %	102381 cpm	95530 = 93,3 %
VIII	73146 cpm	68338 cpm=93,4 %	59254 cpm= 81,0 %	112076 cpm	10674 = 95,2 %
IX	72654 cpm	68225 cpm=93,9 %	61774 cpm= 85,0 %	128740 cpm	123805 = 96,1 %
X	71244 cpm	67468 cpm=94,7 %	59634 cpm= 83,7 %	102400 cpm	94468 = 92,2 %

LEBENS LAUF

Am 27.11.1950 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Dr. Hans-Jürgen Utech und dessen Ehefrau Marlene Utech, geb. Schulze, in Kassel geboren.

1956 trat ich in die dortige Volksschule ein und wechselte 1960 in das mathematisch-naturwissenschaftliche Wilhelms-gymnasium über. Dort legte ich 1969 das Abitur ab.

Nach Ableistung des Grundwehrdienstes begann ich das Studium der Biologie und Chemie an der Justus Liebig-Universität in Gießen. Dort legte ich mit Zulassung des Kultusministeriums Hessen die naturwissenschaftliche Vorprüfung für Mediziner mit dem Gesamturteil "gut" ab. Das Zahnmedizinstudium begann ich im Mai 1973 an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Am 1. Oktober 1974 bestand ich die zahnärztliche Vorprüfung mit dem Gesamturteil "sehr gut" und am 22. Juni 1977 die zahnärztliche Prüfung mit dem Gesamturteil "gut". Meine Bestallung als Zahnarzt wurde mir von dem Landesamt für Jugend und Soziales in Rheinland-Pfalz am 11. Juli 1977 erteilt. Seit dem 1. November 1977 bin ich als Assistenzarzt in der Zahnarztpraxis des Herrn Dr. Fabel in München beschäftigt.

Herrn Professor Dr. B. Morsches
gilt mein besonderer Dank für die
Überlassung des Themas, als auch
für die fachliche Unterstützung
und seine Ratschläge.

Herrn Dr. P. Benes danke ich für
sein stetes Interesse und die von
ihm erfahrene Hilfe.

